

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 011**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2017 PCT/EP2017/073410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018 WO18054813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2017 E 17769050 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3515947**

54 Título: **Nuevos anticuerpos contra el factor XI y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.09.2016 WO PCT/CN2016/099474

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2024

73 Titular/es:

**ARONORA, INC. (100.0%)
1818 SW 4th Ave., Suite 102
Portland, OR 97201, US**

72 Inventor/es:

**WILMEN, ANDREAS;
BUCHMÜLLER, ANJA y
TUCKER, ERIK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 011 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos anticuerpos contra el factor XI y usos de los mismos

Antecedentes

Los trastornos tromboembólicos, incluyendo tanto trombosis venosa como arterial, son una causa principal de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Son causados por la desregulación de la coagulación sanguínea normal (hemostasia) que conduce a la formación anormal de coágulos (trombos) de fibrina, lo que finalmente da como resultado isquemia tisular y, en algunas circunstancias, embolización debido al desplazamiento y migración de fragmentos de coágulo del trombo.

En circunstancias normales, la hemostasia es un mecanismo vital que evita la pérdida de sangre de sitios de lesión vascular induciendo la activación plaquetaria y la formación de fibrina. A nivel mecánico, la hemostasia procede en dos etapas. Durante la hemostasia primaria, las plaquetas se adhieren al sitio del traumatismo y se activan, y finalmente se agregan uniéndose entre sí para formar un tapón plaquetario. La formación de tapones plaquetarios se potencia y estabiliza durante la hemostasia secundaria - una serie de reacciones enzimáticas que implican proteínas de coagulación (también denominadas sistema de coagulación sanguínea) que culminan en la formación de la proteasa trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina para formar un coágulo estable que sella una ruptura en las paredes de los vasos sanguíneos.

Desde 1964, cuando Macfarlane (Nature. 2 de mayo de 1964; 202:498-9) introdujo las hipótesis de cascada para el proceso de coagulación sanguínea, el conocimiento de la función de coagulación sanguínea *in vivo* ha crecido. En los últimos años, se ha revisado la teoría de dos vías distintas, las denominadas vías extrínseca e intrínseca, que inician la coagulación y convergen en una vía común, conduciendo finalmente a la generación de trombina y al depósito de fibrina.

En el modelo actual, el inicio de la coagulación se produce cuando el factor VII activado por proteasa plasmática entra en contacto y, por lo tanto, forma un complejo con el Factor Tisular (FT). Este complejo de Factor Tisular-FVIIa convierte el zimógeno FX en su forma activa FXa, que a su vez escinde la protrombina (factor de coagulación II) para formar trombina (IIa) en presencia del cofactor FVa. La trombina, un agente de coagulación clave, puede catalizar a su vez la transformación de fibrinógeno en fibrina. Por otra parte, la trombina activa receptores específicos expresados por plaquetas, lo que conduce a la activación de estas últimas. Las plaquetas activadas combinadas con fibrina son esenciales para la formación de coágulos y, por lo tanto, son los agentes fundamentales de la hemostasia normal. El complejo FVIIa-FT también convierte FIX en la proteasa FIXa, que, en presencia de FVIIIa, activa FX adicional para mantener la producción de trombina.

La vía de coagulación implica el factor de coagulación XI (FXI). Se confirma bien que FXI es, al igual que los otros miembros de la cascada de coagulación, un zimógeno de serina proteasa plasmática con un papel clave en la unión de la fase de iniciación y la fase de amplificación de la coagulación sanguínea *in vivo* (Davie EW et al., Biochemistry. 29 de octubre de 1991; 30(43):10363-70, Gailani D y Broze GJ Jr., Science. 23 de agosto de 1991; 253 (5022):909-12; Kravitsov DV et al. Blood. 9 de julio de 2009; 114(2):452-8.).

Curiosamente, la deficiencia de FXI normalmente no conduce a hemorragia espontánea, pero está asociada con un mayor riesgo de hemorragia con retos hemostáticos, aunque la gravedad de la hemorragia se correlaciona mal con el nivel plasmático de FXI. Se ha informado de que la deficiencia de FXI grave en seres humanos tiene ciertos efectos protectores de enfermedades trombóticas, incluyendo accidente cerebrovascular isquémico y trombosis venosa profunda (TVP) (Salomon O et al., Thromb Haemost. feb de 2011; 105(2):269-73; Salomon O et al., Blood. 15 de abril de 2008; 111(8):4113-7). Sin embargo, un alto nivel de FXI se ha asociado con eventos trombóticos y se ha notificado que confiere un mayor riesgo de TVP, infarto de miocardio (IM) y accidente cerebrovascular (Meijers JC et al., N Engl J Med. 9 de marzo de 2000; 342(10):696-701).

Tomados en conjunto, estudios previos sugieren que FXI tiene un papel de apoyo menor en el mantenimiento de la hemostasia, pero es un contribuyente crucial a la patogénesis de la trombosis, convirtiendo de este modo FXI en una diana prometedor para la terapia antitrombótica. Esto es así porque, aunque la trombosis y la hemostasia no son procesos moleculares idénticos, son lo suficientemente similares como para que los fármacos antitrombóticos utilizados actualmente se dirijan inadvertidamente a ambos. Los fármacos antitrombóticos disponibles actualmente se dirigen a los elementos esenciales de los trombos (fibrina y plaquetas) o inhiben que moléculas (factores de coagulación) y células (plaquetas) participen en el proceso de formación de trombos. Los agentes antiplaquetarios, profibrinolíticos y anticoagulantes han sido el pilar principal para el tratamiento y prevención de enfermedades tromboembólicas durante décadas y están entre los fármacos más comúnmente prescritos en la práctica clínica. Sin embargo, la mayoría de estos agentes pueden bloquear completamente tanto la trombosis como la hemostasia cuando se administran a dosis eficaces.

Hasta ahora, uno de los pocos ejemplos para un anticuerpo anti-FXI que exhibe potencial terapéutico es el anticuerpo murino 1A6 (también denominado aXIMab) como publicaron Tucker et al. (Prevention of vascular graft occlusion and thromb-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. Erik I. Tucker, Ulla M. Marzec, Tara C. White, Sawan Hurst, Sandra Rugonyi, Owen J. T. McCarty, David Gailani, Andrés Gruber, y Stephen R. Hanson. Blood. 22 de enero de 2009; 113(4):936-944.). El anticuerpo 1A6 también se divulga en la solicitud de patente WO 2009/067660 A2

también publicado como Patente de Estados Unidos Núm. 9.125.895. Sin embargo, puesto que el anticuerpo 1A6 es un anticuerpo murino, no es adecuado para terapias humanas, especialmente para aplicaciones crónicas tales como la terapia antitrombótica. Un método para convertir un anticuerpo murino en un anticuerpo terapéutico aceptable es la denominada humanización. Los mecanismos convencionales están disponibles para el experto en la técnica, tales como los descritos por O'Brien y Jones, en *Humanising Antibodies by CDR Grafting*, Capítulo 40; *Antibody Engineering*, Parte de la serie Springer Lab Manuals pág. 567-590; R. Kontermann et al. (eds.), *Antibody Engineering*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001 y por Hwang, Almagro, Buss, Tan, y Foote (2005) en *Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization*. *Methods*, mayo; 36(1):35-42 y en las referencias de las mismas. Para una reducción adicional del potencial de inmunogenicidad inherente de los anticuerpos humanizados, se requiere una optimización de secuencia y una mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal "germlining" adicionales.

Cuando los Solicitantes aplicaron estos métodos convencionales para humanizar y optimizar el anticuerpo parenteral 1A6, algunos de los anticuerpos resultantes exhibieron actividad de unión en un ensayo bioquímico comparable a la de 1A6 parenteral, sin embargo, mostraron una pérdida significativa de actividad en ensayos basados en plasma y fueron inadecuados en modelos de coagulación in vivo. Hasta ahora, no hay explicación fácilmente disponible de por qué un perfil bioquímico comparable del anticuerpo murino parental 1A6 y variantes humanizadas no se traduce en una actividad antitrombótica eficaz. Sorprendentemente, mediante la introducción de alteraciones adicionales de la secuencia se ha generado una variante humanizada del anticuerpo murino parental 1A6 (anticuerpo TPP-3583) que presenta tanto un perfil bioquímico comparable como una eficacia antitrombótica in vivo.

Con los anticuerpos de esta invención, se han generado moléculas terapéuticas que tienen un riesgo de inmunogenicidad reducido y bloquean eficazmente la trombosis sin hemostasia debilitante, haciendo de este modo más segura la terapia antitrombótica, y ampliando así el intervalo de indicaciones clínicas y escenarios en los que puede aplicarse la terapia antitrombótica.

Compendio

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden

una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO:8);

una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9);

una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10);

una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11);

una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia HIDWDDKYYSPLKS (SEQ ID NO:12); y

una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO:13).

El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo pueden comprender una región VL como se representa en SEQ ID NO: 17 y/o una región VH como se representa en SEQ ID NO: 18.

Se prevé que dicho anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo sean capaces de unirse al factor XI y/o al factor XIa, en particular a un factor XI de primate humano o no humano o a un factor XIa de primate humano o no humano.

Específicamente, se prevé que el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo se unan dentro de una secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio A3 del factor XI que comprende los aminoácidos 200 a 283 de SEQ ID NO: 7 y particularmente a un dominio dentro de una secuencia de aminoácidos correspondiente a a) los aminoácidos 200 a 215 de SEQ ID NO: 7; b) los aminoácidos 221 a 222 de SEQ ID NO: 7; c) los aminoácidos 252 a 254 de SEQ ID NO: 7; d) los aminoácidos 259 a 261 de SEQ ID NO: 7; e) los aminoácidos 270 a 272 de SEQ ID NO: 7; y f) los aminoácidos 276 a 278 de SEQ ID NO: 7. Aquí, la numeración de los aminoácidos del factor XI humano incluye la secuencia señal que comienza con metionina en la posición 1. Se contempla que dicha molécula de unión pueda ser un anticuerpo, y específicamente un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, que es un anticuerpo IgG.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se definen en el presente documento, y un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende dicho polinucleótido. La invención también se refiere a una célula anfitriona que comprende dicho vector o polinucleótido.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula anfitriona como se define en el presente documento en condiciones que permitan la expresión de dicha molécula de unión y opcionalmente recuperar la molécula de unión producida del cultivo.

Por otra parte, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, el vector y/o la célula anfitriona como se definen en el presente documento, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede comprender agentes activos adicionales, en particular agentes antitrombóticos y/o anticoagulantes o puede administrarse como parte de la terapia combinada con agentes activos adicionales.

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo polinucleótido, vector, célula anfitriona o la composición farmacéutica se pueden utilizar en un método para inhibir la coagulación sanguínea, agregación plaquetaria y/o trombosis en un sujeto, y por lo tanto se contemplan para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, en particular trastornos cardiovasculares, preferiblemente trastornos tromboticos o tromboembolicos y/o complicaciones tromboticas o tromboembolicas.

En el presente documento se proporciona adicionalmente el uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo como anticoagulante en muestras de sangre, preservaciones de sangre, productos plasmáticos, muestras biológicas o aditivos medicinales o como recubrimiento en dispositivos médicos.

Por otra parte, la presente invención se refiere a un kit que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector, célula anfitriona o la composición farmacéutica como se describen en el presente documento.

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico in vivo en los ejemplos X, Y y Z de esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos".

Descripción de las figuras

Figura 1: Secuencias del anticuerpo anti-FXI TPP-3583.

Figura 2: Actividades de unión (valor de CE50) del anticuerpo anti-FXI murino 1A6 al factor de coagulación XI humano (FXI).

Figura 3: Actividades de unión (valor de CE50) del anticuerpo anti-FXI humanizado y de línea germinal TPP-3583 que comprende SEQ ID NO: 17 para la secuencia de aminoácidos para el dominio de cadena ligera variable y SEQ ID NO: 18 para la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable.

Figura 4: Actividades de unión (valor de CE50) del anticuerpo anti-FXI humanizado y de línea germinal TPP-3577 que comprende SEQ ID NO: 19 para la secuencia de aminoácidos para el dominio de cadena ligera variable y SEQ ID NO: 20 para la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable.

Figura 5: Actividades de unión (valor de CE50) del anticuerpo anti-FXI humanizado y de línea germinal TPP-3290 que comprende SEQ ID NO: 21 para la secuencia de aminoácidos para el dominio de cadena ligera variable y SEQ ID NO: 22 para la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable.

Figura 6: Actividades de unión (valor de CE50) del anticuerpo anti-FXI humanizado y de línea germinal TPP-3238 que comprende SEQ ID NO: 23 para la secuencia de aminoácidos para el dominio de cadena ligera variable y SEQ ID NO: 24 para la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable.

Figura 7: Análisis de dominio mediante ensayo ELISA competitivo para el anticuerpo TPP-3583.

Figura 8: Neutralización funcional de la conversión de FXI en su forma activa, FXIa, por anticuerpos de esta invención. Inhibición de la conversión inducida por FXIa de FXI en su forma activa FXIa. Actividad inhibidora (valor de CI50) del anticuerpo anti-FXI humanizado y de línea germinal TPP-3583.

Figura 9: Lista de valores de CE50 y valores de aPTT para ciertos anticuerpos.

Figura 10: Medición in vivo del depósito de plaquetas sobre injertos vasculares recubiertos de colágeno después de la aplicación i.v. de TPP3583.

Figura 11: Medición in vivo del depósito de fibrina sobre injertos vasculares recubiertos de colágeno después de la aplicación i.v. de TPP3583.

Descripción detallada

La inhibición de FXI - que se atribuye a un papel crítico en el desarrollo de la formación patológica de trombos, aunque tiene un efecto limitado (o nulo) sobre la homeostasia fisiológica - es un enfoque novedoso prometedor en el desarrollo de nuevos agentes antitrombóticos para lograr una razón beneficio-riesgo mejorada. La presente invención, entre otros, proporciona nuevas moléculas de unión, que son anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que son capaces de unirse específicamente a FXI, inhibiendo de este modo la conversión de FXI en su forma activada FXIa. Por otra parte, también se ha demostrado que las moléculas de unión se unen a FXIa. De este

modo, se cree que las moléculas de unión proporcionadas en el presente documento bloquean la activación de los agentes posteriores implicados en la coagulación de la sangre y la trombosis. Específicamente, los autores de la presente invención proporcionaron versiones humanizadas del anticuerpo anti-FXI murino 1A6 que, ventajosamente, se unen a FXI y también a FXIa con una alta afinidad de unión comparable a 1A6. Por otra parte, las moléculas de unión reducen eficazmente la coagulación de la sangre, como se indica por su capacidad de prolongar el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) a bajas concentraciones. Las moléculas de unión de la presente invención son por lo tanto nuevos agentes prometedores para el tratamiento y/o profilaxis eficaces de trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas y se cree además que son eficaces sin comprometer gravemente la hemostasia, minimizando de este modo el riesgo de hemorragia.

Molécula de unión

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención se obtuvieron mediante humanización y posterior optimización de CDR del anticuerpo anti-FXI murino 1A6 como se divulga en el documento WO 2009/067660 A2. Para su sorpresa, los autores de la presente invención encontraron que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden varias sustituciones de aminoácidos en sus regiones CDR en comparación con las CDR de 1A6 exhibieron propiedades ventajosas. Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención son capaces de unirse a FXI con afinidades de unión comparables a 1A6, e inhibir su conversión en su forma activa FXIa, y reducir eficazmente la coagulación de la sangre. Por el contrario, otras moléculas de unión candidatas que tienen menos o más sustituciones de aminoácidos no exhibieron las mismas propiedades ventajosas.

Por lo tanto, la presente invención, en un primer aspecto, se refiere a anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos capaces de unirse específicamente al factor XI cuyos anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

- a) CDR1 de la cadena ligera: KASQSVDDYDGD SYLN (SEQ ID NO: 1),
- b) CDR2 de la cadena ligera: AASNLES (SEQ ID NO: 2),
- c) CDR3 de la cadena ligera: QQSNGDPWT (SEQ ID NO: 3),
- d) CDR1 de la cadena pesada: TSGMGVVG (SEQ ID NO: 4),
- e) CDR2 de la cadena pesada: HIWWDDDKYYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y
- f) CDR3 de la cadena pesada: KRSSVVAHYAMD (SEQ ID NO:6),

en donde dichas CDR se caracterizan porque al menos dos CDR comprenden acumulativamente 10, 11, 12, 13 o 14 sustituciones de aminoácidos.

Los términos "aminoácido" o "resto de aminoácido" se refieren típicamente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparragina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), aunque se pueden utilizar aminoácidos modificados, sintéticos o raros, según se desee. Generalmente, los aminoácidos se pueden agrupar por tener una cadena lateral no polar (p. ej., Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (p. ej., Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente (p. ej., Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (p. ej., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

Número y distribución de sustituciones

Las sustituciones de aminoácidos pueden distribuirse generalmente a través de las CDR de cualquier manera, es decir, una CDR puede comprender, por ejemplo, un intercambio, y una segunda CDR puede comprender 9, 10, 11, 12 o 13 sustituciones. O dos CDR pueden comprender 5 sustituciones de aminoácidos, o las seis CDR pueden comprender sustituciones de aminoácidos, p. ej., dos sustituciones por CDR. En el presente documento se contemplan particularmente moléculas de unión que comprenden al menos 5 sustituciones de aminoácidos en la CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera y al menos 5 sustituciones de aminoácidos en la CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada. Generalmente, las sustituciones de aminoácidos pueden distribuirse virtualmente de cualquier manera, siempre que el número de sustituciones de aminoácidos acumulativas en comparación con las secuencias de aminoácidos de CDR de 1A6 esté en el intervalo entre 10 y 14 (es decir, incluyendo 10, 11, 12, 13 o 14) y preferiblemente no anule la capacidad de la molécula de unión para unirse al factor XI.

Tipo de sustituciones

En general, es concebible cualquier combinación de sustituciones de aminoácidos en las CDR en comparación con

1A6 siempre que no anule las propiedades ventajosas de las moléculas de unión de la invención. Los intercambios de aminoácidos pueden ser conservativos (es decir, intercambiando un aminoácido de una clase o grupo por otro aminoácido de la misma clase o grupo que se enumera anteriormente) o no conservativos (es decir, intercambiando un aminoácido de una clase/grupo por otro aminoácido de otra clase/grupo).

5 Las sustituciones de aminoácidos particulares que se contemplan según la presente invención incluyen las siguientes:

(a) D₉→L₉, D₁₁→S₁₁ y/o S₁₄→N₁₄ con respecto a SEQ ID NO: 1;

(b) N₆→T₆ con respecto a SEQ ID NO: 2;

(c) S₅→Y₅ con respecto a SEQ ID NO: 3;

(d) G₁₂→C₁₂ con respecto a SEQ ID NO: 4;

10 (e) W₅→D₅, N₁₃→S₁₃ con respecto a SEQ ID NO: 5;

(f) K₃→I₃, V₈→Y₈, A₁₃→G₁₃ y/o Y₁₆→V₁₆ con respecto a SEQ ID NO: 6

Las sustituciones preferidas producen moléculas de unión que conducen a una prolongación de 1,5 veces del aPTT (como se describe en otra parte en el presente documento) a una concentración de 0,03 μM o menos, o 0,015 μM o menos, o 0,01 μM o menos.

15 En particular, las moléculas de unión pueden comprender las siguientes CDR:

(a) una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO:8) o KSSQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO:14), prefiriéndose SEQ ID NO: 8; y/o

(b) una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9); y/o

(c) una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10); y/o

20 (d) una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11); y/o

(e) una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO:12) o HIDWDDDKYYSTSLKS (SEQ ID NO:15), prefiriéndose SEQ ID NO:12; y/o

(f) una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO:13) o IRSSVYAH YYGMDV (SEQ ID NO:16), prefiriéndose SEQ ID NO:13.

25 Como resulta evidente a partir de lo anterior, las moléculas de unión pueden comprender una o más de las CDR mencionadas anteriormente, opcionalmente combinadas.

Una molécula de unión particularmente preferida según la invención, que es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las siguientes CDR: CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO: 8); una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9); una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10); una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11); una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO: 12); y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO: 13).

35 Por otra parte, se prevé que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención comprendan una región variable de la cadena ligera (V_L o región VL) como se representa en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, prefiriéndose una región VL como se representa en SEQ ID NO: 17, y/o una región variable de la cadena pesada (V_H o región VH) como se representa en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, prefiriéndose una región V_H como se representa en SEQ ID NO: 18. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención preferidos comprenden una región V_L representada en SEQ ID NO: 17 y una región V_H representada en SEQ ID NO: 18. Sin embargo, también son concebibles otras combinaciones de regiones V_L y V_H divulgadas en el presente documento. Por consiguiente, una realización preferida es el anticuerpo monoclonal humanizado TPP-3583 con secuencias como se representa en la Figura 1.

Factor XI

45 Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, las moléculas de unión de la invención son preferiblemente capaces de unirse al factor XI.

"Factor XI", también denominado en el presente documento "factor de coagulación XI", "FXI" o "fXI" es una glucoproteína de dos cadenas con un peso molecular de aproximadamente 160 kiloDaltons (kD). Las dos cadenas son polipéptidos idénticos unidos por puentes disulfuro con pesos moleculares de aproximadamente 80.000 daltons. FXI contiene 4 "dominios apple" (A1 a A4 del extremo N terminal, cadena pesada) y un dominio catalítico C-terminal

(cadena ligera). Sin desear vincularse a una teoría específica, se cree que los 4 dominios apple contienen los sitios de unión a FXI para otras proteínas, tales como A1 para trombina; A2 para HK, A3 para factor IX (FIX), GPIb y heparina, y A4 para FXIIa. FXI puede ser convertido en su forma activa, el factor de coagulación XIa (FXIa) por el factor XIIa (FXIIa). La serina proteasa FXIa convierte el Factor de coagulación IX en IXa, que posteriormente activa el Factor de coagulación X (Xa). Xa puede mediar a continuación en la activación del Factor II/Trombina de la coagulación.

En particular, el término "Factor XI" se refiere al factor de coagulación humano XI con Núm. de Acceso Uniprot P03951, versión de entrada 194 del 14 de octubre de 2015 (SEQ ID NO: 7). Como se expone en otra parte en el presente documento, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se contemplan particularmente para unirse a un dominio dentro de una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 200 a 283 de SEQ ID NO: 7. La numeración de los aminoácidos de FXI humano incluye la secuencia señal que comienza con el aminoácido metionina en la posición 1.

El término "posición", cuando se utiliza según la divulgación, significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento o la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento. El término "correspondiente", como se emplea en el presente documento, también incluye que una posición no solo está determinada por el número de nucleótidos/aminoácidos anteriores, sino que más bien debe verse en el contexto de la porción circunyacente de la secuencia. Por consiguiente, la posición de un aminoácido o nucleótido dado según la divulgación puede variar debido a la delección o adición de aminoácidos o nucleótidos en cualquier otro lugar de la secuencia. Por lo tanto, cuando una posición se denomina "posición correspondiente" según la divulgación, se entiende que los nucleótidos/aminoácidos pueden diferir en términos del número especificado, pero pueden tener aún nucleótidos/aminoácidos vecinos similares. Para determinar si un resto de aminoácido (o nucleótido) en una secuencia dada corresponde a una cierta posición en la secuencia de aminoácidos (o secuencia de polinucleótidos) de un aminoácido (o secuencia de polinucleótidos) "parental" (p. ej., la de FXI humano como se representa en SEQ ID NO: 7), el experto en la técnica puede utilizar medios y métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., alineamientos de secuencias, manualmente o utilizando programas informáticos como se ilustra en el presente documento.

El término "epítipo" en general se refiere a un sitio en un antígeno, típicamente un (poli)péptido, que reconoce un dominio de unión, y también puede denominarse "estructura antigénica" o "determinante antigénico". El término "dominio de unión" se refiere a un "sitio de unión a antígeno", es decir, caracteriza un dominio de una molécula de unión que se une/interactúa con un epítipo diana dado en un antígeno o un grupo de antígenos, p. ej., el antígeno idéntico en diferentes especies. Un antígeno diana puede comprender un único epítipo, pero típicamente comprende al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, se debe observar que un "epítipo" en un antígeno diana es típicamente un (poli)péptido diana, pero también puede ser o incluir elementos no polipeptídicos, p. ej., un epítipo puede incluir una cadena lateral de carbohidrato. El término "epítipo" en general abarca epítopos lineales y epítopos conformacionales. Los epítopos lineales son epítopos contiguos comprendidos en la secuencia primaria de aminoácidos y típicamente incluyen al menos 2 aminoácidos o más. Los epítopos conformacionales están formados por aminoácidos no contiguos juxtapuestos por plegamiento del antígeno diana, y en particular del (poli)péptido diana.

Se prevé que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención reconozcan epítopos ubicados en la cadena pesada del factor XI que contienen una secuencia de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 aminoácidos contiguos o no contiguos del factor XI (SEQ ID NO: 7).

En particular, se prevé que las moléculas de unión proporcionadas en el presente documento se unan al dominio A3 del factor XI humano que comprende los aminoácidos 200 a 283 de SEQ ID NO: 7.

Sin embargo, también se prevé que las moléculas de unión puedan unirse a variantes de FXI humano como se especifica anteriormente. El término "variante", cuando se utiliza con relación a FXI, se refiere a un polipéptido que comprende una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en comparación con una secuencia "parental" de FXI y ejerce la misma función biológica, es decir, puede convertirse en su forma activa FXIa que tiene actividad serina proteasa y cataliza la activación del factor IX, desencadenando así la ruta intrínseca de coagulación sanguínea. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas, como se define en el presente documento, o no conservativas o cualquier combinación de las mismas. Las variantes de FXI pueden tener adiciones de restos de aminoácidos en el extremo carboxi terminal o en el extremo amino terminal (donde el extremo amino terminal puede o no comprender una secuencia líder). En particular, el término "variante", cuando se utiliza con relación a FXI, incluye isoformas, variantes alélicas o de corte y empalme, o variantes modificadas postraduccionalmente (p. ej., variantes de glicosilación) de polipéptidos de FXI conocidos, por ejemplo de un polipéptido de FXI que tiene una secuencia representada en SEQ ID NO: 7. Se entenderá fácilmente que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden presentar particularmente una afinidad de unión hacia variantes de FXI que comprenden una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 200 a 283 de SEQ ID NO: 7, o específicamente una secuencia de aminoácidos correspondiente a a) aminoácidos 201 a 215 de SEQ ID NO: 7; b) aminoácidos 221 a 222 de SEQ ID NO: 7; c) aminoácidos 252 a 254 de SEQ ID NO: 7; d) aminoácidos 259 a 261 de SEQ ID NO: 7; e) aminoácidos 270 a 273 de SEQ ID NO: 7; y/o f) aminoácidos 276 a 278 de SEQ ID NO: 7. De acuerdo con lo anterior, también se prevé que las moléculas de unión también sean capaces de unirse a

FXIa y variantes del mismo, siempre que comprendan al menos uno de los tramos de aminoácidos o posiciones de aminoácidos correspondientes a los mismos mencionados anteriormente.

Las moléculas de unión también pueden ser capaces de unirse a FXI de otras especies de mamíferos, preferiblemente especies de primates no humanos. Estos polipéptidos de FXI no humanos están codificados preferiblemente por un gen de FXI u ortólogo o parólogo del mismo y exhiben la misma función biológica que el FXI humano. Las dianas de proteínas de primate no humano potenciales de las moléculas de unión de la invención incluyen polipéptidos con Núm. de Acceso Uniprot. H2QQJ4 (*Pan troglodytes*, versión de entrada 26 del 11 de noviembre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot H2PEX7 (*Pongo abelii*, versión de entrada 27 del 11 de noviembre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot A0A0D9S2M6 (*Clorocebus sabaeus*, versión de entrada 6 del 11 de noviembre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot G3R2X1 (*Gorila gorila gorila*, versión de entrada 27 del 14 de octubre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot A0A096NC95 (*Papio anubis*, versión de entrada 11 del 11 de noviembre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot G1RLE8 (*Nomascus leucogenys*, versión de entrada 28 del 11 de noviembre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot G7PKF5 (*Macaca fascicularis*, versión de entrada 13 del 14 de octubre de 2015), Núm. de Acceso Uniprot G7MSF8 (*Macaca mulatta*, versión de entrada 12 del 14 de octubre de 2015). También se contemplan variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente como dianas para las moléculas de unión de la invención. Se prevé particularmente que las dianas polipeptídicas de primates no humanos contempladas reconocidas por las moléculas de unión comprendan una secuencia correspondiente a los aminoácidos 200 a 283 de SEQ ID NO: 7, y/o una secuencia de aminoácidos correspondiente a a) los aminoácidos 201 a 215 de SEQ ID NO: 7; b) los aminoácidos 221 a 222 de SEQ ID NO: 7; c) los aminoácidos 252 a 254 de SEQ ID NO: 7; d) los aminoácidos 259 a 261 de SEQ ID NO: 7; e) los aminoácidos 270 a 273 de SEQ ID NO: 7; y/o f) los aminoácidos 276 a 278 de SEQ ID NO: 7 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las mismas. Por tanto, también se proporcionan en el presente documento moléculas de unión específica de especies cruzadas dirigidas contra FXI, particularmente en primates no humanos. Los términos "reconocimiento de especies cruzadas" o "especificidad interespecies" como se emplean en el presente documento significan por tanto la unión de una molécula de unión descrita en el presente documento al mismo polipéptido diana en especies humanas y no humanas, particularmente de primates no humanos.

Como se ha expuesto previamente, se prevé que las moléculas de unión descritas en el presente documento también sean capaces de unirse al factor XIa humano o de primate no humano. Por lo tanto, lo que se divulga en el contexto de las características de unión de la molécula de unión en cuanto al Factor XI es preferiblemente igualmente aplicable a sus características de unión en cuanto al Factor XIa, mutatis mutandis.

Anticuerpo

Se prevé en particular que la molécula de unión de la invención sea un anticuerpo. Como es bien conocido en la técnica, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un epítipo diana a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítipo, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Los términos "anticuerpo", "molécula de anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente y en su sentido más amplio en el presente documento e incluyen anticuerpos nativos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), derivados, fragmentos o variantes de anticuerpos (de origen natural o sintéticos), proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida y cualquier otra configuración modificada del anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno de la especificidad requerida. Se prevé que los anticuerpos sean capaces de unirse a FXI como se describe en otra parte en el presente documento, y preferiblemente exhiban las características ventajosas de los anticuerpos TTP-3583 y TTP-3577 como se expone en los ejemplos adjuntos.

Anticuerpo nativo

Un "anticuerpo nativo" es una glucoproteína tetramérica. En un anticuerpo natural nativo, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región "(hiper)variable" de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o CDR o "regiones CDR". Los restos del "marco" o FR son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable.

Tanto las cadenas ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional denominadas "región constante" y "región variable". Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que las regiones variables de las cadenas ligera (V_L) y pesada (V_H) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Los términos " V_L ", "región V_L ", y "dominio V_L " se utilizan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva para referirse a la región variable de la cadena ligera. De manera similar, los términos " V_H ", "región V_H ", y "dominio V_H " se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la región variable de la cadena pesada.

Los términos " C_L ", "región C_L ", y "dominio C_L " se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la región constante de la cadena ligera. Los términos " C_H ", "región C_H ", y "dominio C_H " se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la región constante de la cadena pesada y comprenden las regiones o dominios

"CH1", "CH2", y "CH3". A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento, y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión al antígeno o del extremo amino terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; las regiones CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxi terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, la región VL y VH, o el subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables, de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3, determinadas siguiendo el sistema de numeración de Kabat) en cada una de las regiones VH y VL. Las tres CDR de la cadena ligera también se denominan CDR1 LC o CDR_{L1}, CDR2 LC o CDR_{L2} y CDR3 LC o CDR_{L3} en el presente documento. Las tres CDR de la cadena pesada se denominan CDR1 HC o CDR_{H1}, CDR2 HC o CDR_{H2} y CDR3 HC o CDR_{H3}. En los anticuerpos nativos, las seis "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" o "regiones CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son típicamente secuencias de aminoácidos no contiguas cortas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, no según la invención reivindicada, se prevé que las moléculas de unión y, en particular, los anticuerpos comprendan una CDR1 de la cadena ligera que comprenda o consista en la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO: 8) o KSSQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO: 14), prefiriéndose SEQ ID NO: 8; y/o una CDR2 de la cadena ligera que comprenda o consista en la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9); y/o una CDR3 de la cadena ligera que comprenda o consista en la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10); y/o una CDR1 de la cadena pesada que comprenda o consista en la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11); y/o una CDR2 de la cadena pesada que comprenda o consista en la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO: 12) o HIWDDDDKYYNPSLKS (SEQ ID NO: 15) prefiriéndose SEQ ID NO: 12; y/o una CDR3 de la cadena pesada que comprenda o consista en la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO: 13) o IRSSVYAHYYGMDV (SEQ ID NO: 16), prefiriéndose SEQ ID NO: 13.

Una molécula de unión particularmente preferida según la invención, que es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las siguientes CDR: una CDR1 de la cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO: 8); una CDR2 de la cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9); una CDR3 de la cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10); una CDR1 de la cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11); una CDR2 de la cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO: 12); y una CDR3 de la cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO: 13), todas las cuales se representan en la Fig. 1. El experto en la técnica entenderá fácilmente que las CDR se localizan en la región variable de la cadena ligera y pesada, respectivamente. Una realización particularmente preferida de la invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden un sitio de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 8; una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 9; y una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 10; y un sitio de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 11; una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 12; y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 13. Una realización particularmente preferida adicional de la invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden un sitio de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende una CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 8; una CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 9; y una CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 10; y un sitio de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende una CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 11; una CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 12; y una CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 13. Un anticuerpo monoclonal que comprende las CDR mencionadas anteriormente se evalúa en los ejemplos adjuntos y se denomina "TTP-3583" en el presente documento.

Se prevé que las moléculas de unión y, en particular, los anticuerpos comprendan una región VL representada en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, prefiriéndose una región VL representada en SEQ ID NO: 17, y/o una región VH representada en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, prefiriéndose una región VH representada en SEQ ID NO: 18. Por consiguiente, los anticuerpos preferidos de la invención comprenden una región VL representada en SEQ ID NO: 17 y una región VH representada en SEQ ID NO: 18. Sin embargo, no según la invención reivindicada, también son concebibles otras combinaciones de regiones VL y VH divulgadas en el presente documento.

Se prevé que las moléculas de unión y, en particular, los anticuerpos comprendan una cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 29, prefiriéndose una cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27, y/o una cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, prefiriéndose una cadena pesada representada en SEQ ID

NO: 28. Por consiguiente, los anticuerpos preferidos de la invención comprenden una cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27 y una cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28. Sin embargo, no según la invención reivindicada, también son concebibles otras combinaciones de cadenas ligeras y pesadas divulgadas en el presente documento.

Una realización particularmente preferida de la invención es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden una región V_L representada en SEQ ID NO: 17 y una región V_H representada en SEQ ID NO: 18. Una molécula de unión particularmente preferida según la invención es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden una secuencia de cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27 y una secuencia de cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28. Una molécula de unión particularmente preferida según la invención es un anticuerpo monoclonal que consiste en una secuencia de cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27 y una secuencia de cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28. Un anticuerpo monoclonal particularmente preferido según la invención es el anticuerpo TPP-3583.

La porción carboxi-terminal de cada cadena ligera y pesada define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cadenas pesadas se clasifican como μ (μ), delta (Δ), gamma (γ), alfa (α) y épsilon (ϵ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases o isotipos, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 a menudo tienen actividad ADCC. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes. Los anticuerpos según la invención pueden ser anticuerpos IgG, específicamente IgG1.

Anticuerpos monoclonales

De acuerdo con la presente invención, se contemplan particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El término "anticuerpo monoclonal" como se emplea en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, los anticuerpos monoclonales contienen sitios de unión a epítopos sustancialmente similares y, por lo tanto, se dirigen típicamente contra el mismo epítipo en un antígeno. El término "anticuerpo monoclonal" incluye por tanto anticuerpos monoclonales recombinantes, quiméricos, humanizados, humanos o Human Engineered™.

Se conocen en la técnica diversos métodos de producción para generar anticuerpos monoclonales y son descritos, p. ej., por Goding, en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 116-227 (Academic Press, 1996). Las técnicas adecuadas incluyen el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), métodos de ADN recombinante que implican el aislamiento y secuenciación de ADN que codifica los anticuerpos monoclonales, y su posterior introducción y expresión en células anfitrionas adecuadas, y el aislamiento de anticuerpos a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados utilizando las técnicas descritas por primera vez por McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990).

Anticuerpo quimérico

Como se expone en otra parte en el presente documento, el término "anticuerpo" también incluye anticuerpos quiméricos. La expresión "anticuerpo quimérico", como se emplea en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene una secuencia derivada de dos anticuerpos diferentes que típicamente se originan de especies diferentes. Específicamente, el término se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos.

Dicho de otro modo, el término "anticuerpo quimérico" se mantendrá para significar cualquier anticuerpo en donde el sitio de unión al antígeno se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, ser parcial o estar modificada según la presente invención) se obtiene de una segunda especie. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno puede ser de una fuente no humana (p. ej., ratón o primate) y la región constante puede ser humana.

Típicamente, los anticuerpos quiméricos pueden comprender, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones humanas y variables de ratón.

Anticuerpo humanizado

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la presente invención se refiere en particular a anticuerpos humanizados (monoclonales) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos derivados del anti-FXI

humano 1A6 de ratón como se describe en el documento WO 2009/067660 A2.

Un "anticuerpo humanizado" se define generalmente como uno que (I) deriva de una fuente no humana (p. ej., un ratón transgénico que porta un sistema inmunitario heterólogo), cuyo anticuerpo se basa en una secuencia de línea germinal humana; o (II) está injertado con CDR, en donde las CDR de la región variable son de origen no humano, mientras que una o más regiones marco y/o parte de la secuencia de CDR de la región variable son de origen humano y típicamente la región constante (si la hay) es de origen humano.

El término "anticuerpo humanizado" incluye por tanto anticuerpos en los que la región variable en la cadena pesada o ligera o ambas de un anticuerpo humano se altera mediante al menos reemplazo parcial de una o más CDR de un anticuerpo no humano de especificidad conocida y, si es necesario, mediante reemplazo parcial de la región marco y cambio de secuencia. En otras palabras, un anticuerpo en el que una o más CDR "donadoras" de un anticuerpo no humano (tal como anticuerpo de ratón, rata, conejo o primate no humano) de especificidad conocida se injerta en una región marco de la cadena pesada o ligera humanas se denomina en el presente documento "anticuerpo humanizado". Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR por las CDR completas del dominio variable donador para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, puede ser necesario solamente transferir aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a la diana.

Los autores de la presente invención humanizaron el anticuerpo 1A6 de ratón determinando los restos de CDR de 1A6 y seleccionando de una base de datos una secuencia de la línea germinal humana con la mejor homología global con las secuencias de V_H y V_L murina como marco de la línea germinal humana aceptora para injertar las CDR de V_H y V_L , respectivamente, como se detalla en el Experimento 1. Posteriormente, los anticuerpos humanizados generados se sometieron a optimización de CDR como se describe en el Experimento 2, intercambiando los aminoácidos en 1A6 por los aminoácidos correspondientes en la secuencia de la línea germinal humana más cercana en identidad y homología de secuencia ("sometidos a mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal"). Los autores de la presente invención encontraron después que los anticuerpos 1A6 humanizados sometidos a mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal que comprenden 10, 11, 12, 13 o 14 sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR, y en particular que comprenden las secuencias de CDR divulgadas en otra parte en el presente documento, muestran propiedades ventajosas en términos de características de unión y actividad biológica, mientras que los anticuerpos con más (TTP-3283, TTP3290) o menos sustituciones de aminoácidos no lo hicieron.

Para los fines de la presente invención, los anticuerpos humanizados con optimización de CDR ("sometidos a mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal") están comprendidos dentro del término anticuerpos "humanizados".

Las regiones marco (FR) dentro de la región variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado pueden comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones marco del anticuerpo humanizado se denominan "regiones marco completamente humanas". Una región marco humana que comprende una mezcla de restos marco humanos y donadores, se denomina en el presente documento "región marco parcialmente humana". Por otra parte, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo (p. ej., para obtener la afinidad deseada).

En general, el anticuerpo humanizado comprenderá así sustancialmente todas de al menos una, y típicamente dos, regiones variables, en las que todas o parte de las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Anticuerpo humano

Un anticuerpo "humano" se define como aquel que no es quimérico o "humanizado" y que no es de (en su totalidad o en parte) una especie no humana. Un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo funcional se pueden obtener de un ser humano o pueden ser un anticuerpo humano sintético. Un "anticuerpo humano sintético" se define en el presente documento como un anticuerpo que tiene una secuencia derivada, en su totalidad o en parte, *in silico* a partir de secuencias sintéticas que se basan en el análisis de secuencias de anticuerpos humanos conocidos. El diseño *in silico* de una secuencia de anticuerpo humano o fragmento de la misma se puede lograr, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo y diseñando una secuencia de aminoácidos utilizando los datos obtenidos a partir de la misma. Otro ejemplo de un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo funcional es aquel que está codificado por un ácido nucleico aislado de una biblioteca de secuencias de anticuerpos de origen humano (es decir, basándose tal biblioteca en anticuerpos tomados de una fuente natural humana).

Fragmentos, variantes y derivados

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la invención abarca anticuerpos de longitud completa, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos.

Fragmentos

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a un polipéptido derivado de un anticuerpo "parental" y que conserva su estructura y función básicas. Un fragmento de anticuerpo es por tanto preferiblemente capaz de unirse a su antígeno específico, es decir FXI. Además, un fragmento de anticuerpo según la invención comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión al antígeno. Este requisito mínimo puede definirse, p. ej., por la presencia de al menos las tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región V_L , es decir, CDR_{L1} , CDR_{L2} y CDR_{L3}) y/o las tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región V_H , es decir, CDR_{H1} , CDR_{H2} y CDR_{H3}). Dicho de otro modo, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a un polipéptido "funcional" o "de unión a antígeno" que conserva el sitio de unión a antígeno (es decir, las CDR y opcionalmente (parte de) la FR) de un anticuerpo "parental". Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden derivar, por ejemplo, de anticuerpos "parentales" monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados y humanos.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno preferidos comprenden al menos una, preferiblemente todas, de una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO: 8); una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9); una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10); una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11); una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO: 12); y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la cadena de secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO: 13).

De acuerdo con lo anterior, el término "fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno" se refiere particularmente a fragmentos de anticuerpos de longitud completa, tales como (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ o "r IgG" ("hemianticuerpo"). Los fragmentos de anticuerpo según la invención también pueden ser fragmentos modificados de anticuerpos tales como scFv, di-scFv o bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-cremallera, scFab, Fab2, Fab3, dianticuerpos, dianticuerpos monocatenarios, dianticuerpos en tándem (Tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, "minianticuerpos" ilustrados por una estructura que es la siguiente: $(V_H-V_L-CH_3)_2$, $(scFv-CH_3)_2$ o $(scFv-CH_3-scFv)_2$, multianticuerpos tales como trianticuerpos o tetraanticuerpos. Además, la definición del término "fragmentos de anticuerpo" incluye construcciones que comprenden dichos fragmentos, es decir, construcciones monovalentes, bivalentes y polivalentes/multivalentes y, por tanto, construcciones monoespecíficas, que se unen específicamente a solo un antígeno diana, así como construcciones biespecíficas y poliespecíficas/multiespecíficas, que se unen específicamente a más de un antígeno diana, p. ej., dos, tres o más, a través de sitios de unión a antígeno distintos. Por otra parte, la definición del término "fragmentos de anticuerpo" incluye moléculas que consisten en una sola cadena polipeptídica, así como moléculas que consisten en más de una cadena polipeptídica, cuyas cadenas pueden ser idénticas (homodímeros, homotrímeros u homo-oligómeros) o diferentes (heterodímeros, heterotrímeros o hetero-oligómeros).

Los fragmentos de anticuerpo pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los métodos para producir tales fragmentos son bien conocidos en la técnica.

Variantes

El término "variante" se refiere a polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión "parental", tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, pero que contiene al menos una modificación de aminoácido (p. ej., una sustitución, delección o inserción) en comparación con la secuencia de aminoácidos "parental", siempre que la variante todavía sea capaz de unirse (específicamente) a FXI, en particular FXI humano como se representa en SEQ ID NO: 7, y preferiblemente exhibe características similares o incluso mejoradas en comparación con los anticuerpos TTP-3583 y/o TTP-3577 como se evalúa en los Ejemplos adjuntos. Las variantes de las moléculas de unión de la invención, particularmente de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, se preparan típicamente introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Generalmente, las modificaciones de aminoácidos mencionadas anteriormente pueden introducirse en, o estar presentes en, la región variable o la región constante, bajo la premisa de que dos o más CDR de las variantes comprenden acumulativamente 10, 11, 12, 13 o 14 sustituciones de aminoácidos en comparación con las CDR de 1A6 como se representa en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Las modificaciones de aminoácidos se pueden introducir, por ejemplo, para modular las propiedades de los anticuerpos como la estabilidad termodinámica, la solubilidad o la viscosidad que afectan al desarrollo farmacéutico ("optimización de la secuencia").

Como se ha expuesto anteriormente, las modificaciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de moléculas de unión descritas en el presente documento, preferiblemente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno. Cualquier combinación de delección, inserción y sustitución puede introducirse en la secuencia de aminoácidos "parental" con el fin de llegar al producto final, siempre que posea las características deseadas como se expone en otra parte del presente documento. Las modificaciones de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales de las moléculas de unión, tales como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación.

Por ejemplo, no según la invención reivindicada, se pueden insertar o eliminar 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos en cada

una de las CDR (por supuesto, dependiendo de su longitud), mientras que se pueden insertar o eliminar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos en cada una de las FR. Las inserciones de secuencias de aminoácidos contempladas en la presente memoria incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales con una longitud que varía entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 restos a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuenciales de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Una variante por inserción de una molécula de unión, en particular un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, incluye un producto de fusión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y una enzima u otro polipéptido funcional (p. ej., que aumenta la semivida en suero de la molécula de unión, p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo).

No según la invención reivindicada, las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en las CDR de la cadena pesada y/o ligera, en particular las regiones hipervariables, o las regiones FR en la cadena pesada y/o ligera. En el presente documento se contemplan particularmente sustituciones conservativas de aminoácidos que pueden realizarse, por ejemplo, basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo y/o naturaleza anfipática de los restos implicados.

No según la invención reivindicada, preferiblemente, se pueden sustituir entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 aminoácidos en las CDR, siempre que la variante de anticuerpo comprenda acumulativamente 10, 11, 12, 13 o 14 sustituciones de aminoácidos en comparación con las CDR de 1A6 representadas en SEQ ID NO: 1-6, mientras que se pueden sustituir entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 25 aminoácidos en las regiones marco (FR), dependiendo de la longitud de la CDR o FR.

Generalmente, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDR de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "variante" obtenida después sea al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de CDR "parental". La longitud de la CDR influye así en el número de sustituciones de aminoácidos posibles de modo que la secuencia variante todavía está abarcada por la invención. Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferiblemente 80% idéntica a su secuencia sustituida con el fin de tener al menos un aminoácido sustituido. Por consiguiente, las CDR de la construcción de anticuerpo pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias sustituidas, p. ej., CDR_{L1} puede tener 80%, mientras que CDR_{L3} puede tener 90%.

Las sustituciones (o reemplazos) preferidas son sustituciones conservativas. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ilustrativas) siempre que la construcción de anticuerpo conserve su capacidad para unirse a FXI y/o sus CDR tengan una identidad con la secuencia sustituida a continuación de al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Como se utiliza en el presente documento, el término "identidad de secuencia" indica el grado en que dos secuencias (de nucleótidos o aminoácidos) tienen restos idénticos en las mismas posiciones en un alineamiento, y a menudo se expresa como un porcentaje. Preferiblemente, la identidad se determina a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por lo tanto, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen 100% de identidad, pero las secuencias que están menos altamente conservadas, y tienen delecciones, adiciones o reemplazos, pueden tener un menor grado de identidad. Los expertos en la técnica reconocerán que están disponibles varios algoritmos para determinar la identidad de secuencia utilizando parámetros convencionales, por ejemplo, Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410), Smith-Waterman (Smith et al. (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197) y ClustalW. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 o 13 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31 o 32 pueden servir como "secuencia objeto" o "secuencia de referencia", mientras que la secuencia de aminoácidos o secuencia de ácidos nucleicos de un polipéptido diferente de la misma pueden servir como "secuencia problema".

El término "homología de secuencia" indica la similitud de dos secuencias (de nucleótidos o aminoácidos) atribuidas a la disminución de un antepasado común. Los componentes biológicos homólogos (genes, proteínas, estructuras) se denominan homólogos e incluyen ortólogos y parálogos.

Las variantes de moléculas de unión preferidas no según la invención reivindicada tienen una identidad u homología de secuencia en las regiones CDR de al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o casi 100% y muestran una afinidad de unión comparable o mejorada a FXI y/o una actividad biológica comparable o mejorada en comparación con moléculas de unión que comprenden las CDR "parentales", en particular SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Por otra parte, la homología o similitud de secuencia de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótidos que codifican CDR variantes individuales y las secuencias de nucleótidos representadas en el presente documento son al menos de 80% y más típicamente homólogas o identidades preferiblemente crecientes de al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y casi 100%.

No según la invención reivindicada, además de en las CDR y FR, también pueden introducirse modificaciones de aminoácidos en la parte Fc de una molécula de unión, que es preferiblemente un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo. Tales modificaciones se pueden utilizar para modular propiedades funcionales del

anticuerpo, p. ej. interacciones con las proteínas del complemento tales como receptores C1q y/o Fc en otras células inmunitarias, o para modular la semivida en suero o citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC). Por tanto, se pueden introducir mutaciones para la modificación de funciones efectoras en los dominios Fc utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Las modificaciones ilustrativas incluyen Asn297 -> Ala297 y Asn297 -> Gln297 que dan como resultado la aglicosilación de IgG1, o Lys322 -> Ala322 y opcionalmente Leu234→Ala234 y Leu235 -> Ala234, que se ha informado que reducen o suprimen la citotoxicidad mediada por células derivada de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad derivada de complemento (CDC).

Derivados

El término "molécula de unión" también abarca derivados. En el presente documento se contemplan particularmente derivados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como se divulga en otra parte del presente documento. El término "derivado" se refiere generalmente a una molécula de unión que se ha modificado covalentemente para introducir una funcionalidad adicional. Las modificaciones covalentes de las moléculas de unión se realizan generalmente, pero no siempre, post-traduccionalmente, y se pueden introducir en la molécula de unión haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos de la molécula con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C-terminales. La derivatización de moléculas de unión se puede utilizar para anclar agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcas, grupos que prolongan la semivida en suero de la molécula o inserción de aminoácidos no naturales. Las posibles modificaciones químicas de las moléculas de unión de la invención incluyen acilación o acetilación del extremo N-terminal o amidación o esterificación del extremo C-terminal o, alternativamente, en ambos. También se contemplan modificaciones químicas tales como alquilación (p. ej., metilación, propilación, butilación), arilación y eterificación.

Prolongación de la semivida en suero

Los ejemplos de medios para prolongar semivida en suero de las moléculas de unión, y en particular anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen el anclaje de péptidos o dominios proteicos que se unen a otras proteínas en el cuerpo humano (tal como albúmina de suero, la región Fc de inmunoglobulina o el receptor de Fc neonatal (FcRn)). Otras modificaciones concebibles para prolongar la semivida en suero comprenden la extensión de un grupo amino con cadenas polipeptídicas de longitud variable (p. ej., tecnología XTEN o PASilación®). La conjugación de polímeros no proteicos, incluyendo, pero sin limitarse a, diversos políoles tales como polietilenglicol (PEGilación), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, o de hidratos de carbono, tales como hidroxietilalmidón (p. ej., HESilación®) o ácido polisilático (p. ej., tecnología PoliXen®). Además, como se conoce en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la molécula de unión con el fin de facilitar la adición de dichos polímeros.

Glicosilación

Otro tipo de modificación covalente de las moléculas de unión y en particular anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención comprende alterar su patrón de glicosilación. Como se sabe en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de aminoácidos de dicha molécula (p. ej., la presencia o ausencia de restos de aminoácidos de glicosilación particulares, comentados más adelante), como de la célula u organismo anfitrión en el que se produce la proteína. La glicosilación de polipéptidos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere al anclaje del radical carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparragina. La adición de sitios de glicosilación ligados a N a la molécula de unión se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más secuencias tripeptídicas seleccionadas entre asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Los sitios de glicosilación ligados a O pueden introducirse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia de partida.

Otro medio de glicosilación de la molécula de unión es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula anfitriona que tiene capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o los azúcares se pueden anclar a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina.

De manera similar, la desglicosilación (es decir, la eliminación de radicales carbohidrato presentes en la molécula de unión) se puede realizarse químicamente, p. ej., mediante la exposición de la molécula de unión a ácido trifluorometanosulfónico, o enzimáticamente empleando endo- y exo-glicosidasas.

Marcaje

Otras modificaciones covalentes potenciales de las moléculas de unión de la invención comprenden la adición de una o más marcas. El grupo de marcaje se puede acoplar a la molécula de unión a través de espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y se pueden utilizar en la realización de la presente invención. Los términos "marca" o "grupo de marcaje" se refieren a cualquier marca detectable. En general, las marcas se incluyen en una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que van a detectarse - las siguientes marcas ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a: marcas

isotópicas, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, tales como radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I); marcas magnéticas (p. ej., partículas magnéticas); radicales activos redox; colorantes ópticos (incluyendo, pero sin limitarse a, cromóforos, fósforos y fluoróforos) tales como grupos fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos lantánidos), grupos quimioluminiscentes y fluoróforos que pueden ser fluoróforos de "molécula pequeña" o fluoróforos proteicos; grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina; grupos biotinilados; o epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión metálicos, etiquetas epitópicas, etc.)

ADC

También es concebible añadir un fármaco, tal como un compuesto de molécula pequeña, a las moléculas de unión y en particular anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los "productos conjugados anticuerpo-fármaco", abreviado "ADC" son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos conectados al fármaco o agente. La conexión se puede establecer a través de enlaces covalentes, o de interacciones no covalentes tal como a través de fuerzas electrostáticas. Se pueden emplear varios conectores, conocidos en la técnica, para formar el ADC como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento.

Etiquetas de afinidad

La molécula de unión, y en particular el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención también pueden comprender dominios adicionales, que ayudan en la purificación y aislamiento de la molécula (etiquetas de afinidad). Los ejemplos no limitantes de tales dominios adicionales comprenden motivos peptídicos conocidos como etiqueta Myc, etiqueta HAT, etiqueta HA, etiqueta TAP, etiqueta GST, dominio de unión a quitina (etiqueta CBD), proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Flag, etiqueta Strep y variantes de los mismos (p. ej., etiqueta Strep II) y etiqueta His.

Los fragmentos, variantes y derivados mencionados anteriormente se pueden adaptar adicionalmente con el fin de mejorar, p. ej., sus propiedades de unión a antígeno. Por ejemplo, F(ab')_2 o Fab se pueden modificar mediante ingeniería genética para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios CH_1 y CL . Los polipéptidos Fv pueden comprender adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que Fv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y la primera región constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal de la región CH_1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de la región constante llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')_2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen restos de cisteína de la bisagra entre ellos.

Las moléculas de unión se pueden proporcionar en forma "aislada" o "sustancialmente pura". "Aislada" o "sustancialmente pura" cuando se utilizan en el presente documento significan que la molécula de unión se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción, de modo que la molécula de unión "aislada" está libre o sustancialmente libre de otros componentes contaminantes de su entorno de producción que podrían interferir en su uso terapéutico o diagnóstico. Los componentes contaminantes pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Las moléculas de unión "aisladas" se prepararán por lo tanto mediante al menos una etapa de purificación que elimina o elimina sustancialmente estos componentes contaminantes. La definición mencionada anteriormente es igualmente aplicable a polinucleótidos "aislados", mutatis mutandis.

Unión específica

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, en particular anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son ventajosamente capaces de unirse al factor XI, en particular factor XI humano que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 7. Los términos "unirse a" y "reconocer" en todas las formas gramaticales se utilizan indistintamente en el presente documento. Preferiblemente, dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según las reivindicaciones se unen específicamente al factor XI. El término "se une específicamente" indica generalmente que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describen en el presente documento, se unen a través de su sitio de unión a antígeno más fácilmente a su epítipo diana previsto que a un epítipo no diana aleatorio no relacionado. Particularmente, el término "se une específicamente" indica que la afinidad de la molécula de unión será al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente 10 veces, más preferiblemente 25 veces, incluso más preferiblemente 50 veces, y lo más preferiblemente 100 veces o más, mayor para su epítipo diana que su afinidad para un epítipo no diana.

Por tanto, se puede considerar que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a su epítipo diana si se unen a dicho epítipo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para un epítipo no diana, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención también pueden describirse en términos de su afinidad de unión al factor XI, en particular al factor XI

humano. Los términos "afinidad" o "afinidad de unión" se refieren a la fuerza de la unión de un epítipo individual a un dominio de unión a antígeno (y en particular las CDR de la molécula de unión). La afinidad de la unión de una molécula de unión dada a su epítipo específico se determina a menudo midiendo la constante de asociación en equilibrio (K_a) y la constante de disociación en equilibrio (K_d) y calculando el cociente de K_d a K_a ($K_D = K_d/K_a$). Las afinidades de unión pueden determinarse fácilmente utilizando técnicas convencionales, tal como mediante diálisis en equilibrio; utilizando el aparato BIAcore 2000; mediante radioinmunoensayo utilizando antígeno diana radiomarcado; o mediante otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, mediante el método descrito por Kaufman RJ y Sharp PA. 159:601-621 (1982) en J Mol Biol. Las afinidades de unión preferidas de las moléculas de unión de la invención incluyen aquellas con una constante de disociación o K_D menor de 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Reactividad cruzada

Sin embargo, el término "se une específicamente" no excluye que las moléculas de unión (específicamente) que se unen al factor XI humano reaccionen de manera cruzada con una proteína del factor XI de una especie diferente. Por consiguiente, las moléculas de unión de la invención también pueden ser capaces de unirse a FXI de otras especies de mamíferos, preferiblemente especies de primates no humanos como se ilustra en otra parte en el presente documento.

Unión o reconocimiento de "especies cruzadas" significa unión de un dominio de unión descrito en el presente documento al mismo antígeno diana en seres humanos y especies no humanas. Por tanto, "especificidad de especies cruzadas" debe entenderse como una reactividad entre especies con el Factor XI expresado en diferentes especies, pero no con un antígeno distinto del Factor XI. Por ejemplo, un dominio de unión que se une al factor XI humano, en particular al dominio A3 que comprende los aminoácidos 200 a 283 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 también puede unirse al factor XI de primate no humano, y en particular a una región correspondiente a los aminoácidos 200 a 283 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7.

Actividad biológica

Se prevé que las moléculas de unión proporcionadas en el presente documento sean biológicamente activas, es decir, se unan al Factor XI y/o al Factor XIa y bloqueen sus respectivas funciones biológicas. Específicamente, las moléculas de unión "biológicamente activas" según la invención bloquean la conversión del Factor XI en su forma activa (Factor XIa) y/o bloquean la unión del Factor IX de coagulación aguas abajo al Factor XIa, dando como resultado preferiblemente una inhibición completa o parcial de la actividad del Factor XI y/o el Factor XIa. Se prevé, por tanto, que la unión de las moléculas de unión biológicamente activas a su Factor XI y/o Factor XIa diana dé como resultado una actividad anticoagulante. Dicho de otro modo, se prevé que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención ejerzan su función beneficiosa a través de a) la unión al Factor XI, bloqueando de ese modo su conversión en su forma activa, Factor XIa y/o b) la unión al Factor XIa, bloqueando de ese modo su unión a y activación del Factor de coagulación IX aguas abajo. Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención interrumpen de ese modo preferiblemente la "ramificación FXI" de la cascada de coagulación y de ese modo previenen la trombosis, ventajosamente sin afectar a la hemostasia normal.

Se puede determinar la actividad anticoagulante de una molécula de unión *in vitro* como se describe en los Experimentos adjuntos. En resumen, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) se determina en presencia de concentraciones variables de dicha molécula de unión o el disolvente correspondiente utilizando un kit de prueba comercial (reactivo de PTT de Roche). Los compuestos de ensayo se incuban con el plasma y el reactivo de PTT (cefalina, caolín) a 37°C durante 3 minutos. La coagulación se inicia después mediante la adición de cloruro de calcio 25 mM, y se determina el tiempo en el que se produce la coagulación. Se determina la concentración de la sustancia de prueba que efectúa una prolongación de 1,5 veces del aPTT.

Se prevé que las concentraciones de las moléculas de unión de la presente invención conduzcan a una prolongación de 1,5 veces del aPTT a una concentración de 0,03 μ M o menos, o 0,015 μ M o menos, o 0,01 μ M o menos.

Ventajosamente, las moléculas de unión y en particular los anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención exhiben las propiedades biológicas mencionadas anteriormente y son por lo tanto prometedores nuevos agentes para la inhibición de la trombosis. Debido a que las moléculas de unión se contemplan particularmente para unirse específicamente al Factor XI, se prevé que no comprometan la hemostasia, o no lo hagan gravemente, y por lo tanto preferiblemente no aumenten el riesgo de hemorragia.

Polinucleótido

La invención proporciona adicionalmente una molécula de polinucleótido/ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígenos del mismo o un dominio V_H y un dominio V_L de la invención.

El término "polinucleótido" como se emplea en el presente documento comprende polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, p. ej., ARN o ADN modificados o no modificados, cada uno en forma de hebra sencilla y/o de doble hebra, lineal o circular, o mezclas de los mismos, incluyendo moléculas híbridas. Un polinucleótido puede

comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (p. ej., un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos peptidonucleicos (PNA)). Los polinucleótidos de la invención también pueden contener una o más bases modificadas, tales como, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. También son concebibles otras modificaciones, incluyendo modificaciones químicas, enzimáticas o metabólicas, siempre que pueda expresarse a partir del polinucleótido una molécula de unión de la invención. El polinucleótido se puede proporcionar en forma aislada como se define en otra parte en el presente documento. Un polinucleótido puede incluir secuencias reguladoras tales como elementos de control de la transcripción (incluyendo promotores, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción), sitios de unión a ribosoma, intrones o similares.

Por consiguiente, no según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que comprende, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada de inmunoglobulina (región V_H), donde al menos una de las CDR de la región V_H tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o idéntica a uno cualquiera de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 15 o 16, prefiriéndose SEQ ID NO: 11-13. Adicionalmente, la presente divulgación incluye un polinucleótido que comprende, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de región V_H de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 20, prefiriéndose SEQ ID NO: 18. Se prevé que una molécula de unión que comprende las CDR o dominios V_H codificados sea capaz de unirse a FXI y preferiblemente exhiba las actividades biológicas deseadas como se describe en otra parte en el presente documento.

Adicionalmente, no según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que comprende, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio de cadena ligera de inmunoglobulina (región V_L), donde al menos una de las CDR de la región V_L tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o idéntica a uno cualquiera de SEQ ID NO: 8, 9, 10 o 14, prefiriéndose SEQ ID NO: 8-10. Por otra parte, la presente divulgación incluye un polinucleótido que comprende, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de región V_L de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 o 19, prefiriéndose SEQ ID NO: 17. Se prevé que una molécula de unión que comprende las CDR o regiones V_L codificada sea capaz de unirse a FXI y preferiblemente exhiba las actividades biológicas deseadas como se describe en otra parte en el presente documento.

Adicionalmente, no según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, o consiste en un ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o 100% idéntico a una secuencia polinucleotídica de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, 32, 33 y 34.

Los polinucleótidos descritos anteriormente pueden comprender o no secuencias de nucleótidos adicionales, que codifican, p. ej., un péptido señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, regiones constantes de anticuerpo como se describe en el presente documento u otros polipéptidos heterólogos como se describe en el presente documento. Tales polinucleótidos pueden codificar por tanto polipéptidos de fusión, fragmentos, variantes y otros derivados de las moléculas de unión descritas en el presente documento.

Asimismo, no según la invención reivindicada, la presente divulgación incluye composiciones que comprenden uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente. También se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en donde dicho primer polinucleótido codifica una región V_H como se describe en el presente documento y en donde dicho segundo polinucleótido codifica una región V_L como se describe en el presente documento, específicamente una composición que comprende, o consiste en una región V_H seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 20 (prefiriéndose SEQ ID NO: 18) y/o una región V_L seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y 19 (prefiriéndose SEQ ID NO: 17).

Producción de polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención pueden producirse mediante métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos de la molécula de unión, se puede ensamblar un polinucleótido que codifica la molécula de unión a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente, reasociación y ligación de esos oligonucleótidos, y después amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR. Se puede obtener un polinucleótido que codifica una molécula de unión a partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc, o un ácido nucleico

tal como un ARNm poli(A)+ aislado de cualquier tejido o células que expresan la molécula de unión tal como células de hibridoma) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular a identificar, p. ej., un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica la molécula de unión.

- 5 Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la molécula de unión, su secuencia de nucleótidos se puede modificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p. ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc., introduciendo de ese modo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de polinucleótidos (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por J. Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2012)) para
- 10 generar fragmentos, variantes o derivados de la molécula de unión que no se producen de manera natural, y en particular el anticuerpo monoclonal anti-FXI descrito en el presente documento (p. ej., una región de cadena pesada o región de cadena ligera de inmunoglobulina).

Vectores

- 15 En el presente documento se proporciona adicionalmente un vector que comprende el polinucleótido como se describe en el presente documento. Dicho polinucleótido codifica una molécula de unión de la invención, en particular un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo. Un "vector" es una molécula de ácido nucleico utilizada como vehículo para transferir material genético (foráneo) a una célula anfitriona donde, por ejemplo, se puede replicar y/o expresar.
- 20 El término "vector" abarca, sin limitación, plásmidos, vectores virales (incluyendo vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores de virus vaccinia, vectores de virus de poliovirus y vectores asociados a adenovirus (AAV)), fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales (incluyendo BAC y YAC). El propio vector es generalmente una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN que comprende un inserto (transgén) y una secuencia más grande que sirve como la "cadena principal" del vector. Los vectores modificados
- 25 genéticamente comprenden típicamente un origen para replicación autónoma en las células anfitrionas (si se desea expresión estable del polinucleótido), marcadores de selección, y sitios de escisión de enzimas de restricción (p. ej., un sitio de clonación múltiple, MCS). El vector puede comprender adicionalmente promotores, marcadores genéticos, genes informadores, secuencias de direccionamiento y/o etiquetas de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) se diseñan específicamente para la expresión del transgén en la célula diana, y generalmente tienen secuencias de control.
- 30

Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores adecuados y muchos están disponibles comercialmente. J. Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2012) proporcionan ejemplos de vectores adecuados.

Vectores de direccionamiento

- 35 Los vectores de direccionamiento se pueden utilizar para integrar un polinucleótido en el cromosoma de la célula anfitriona (tal como describen J. Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2012)). Brevemente, los medios adecuados incluyen recombinación homóloga o uso de una recombinasa híbrida que se dirige específicamente a secuencias en los sitios de integración. Los vectores de direccionamiento son típicamente circulares y linealizados antes de utilizarse para la
- 40 recombinación homóloga. Como alternativa, los polinucleótidos foráneos pueden ser fragmentos de ADN unidos por PCR de fusión o fragmentos de ADN contruidos sintéticamente que después se recombinan en la célula anfitriona. También es posible utilizar recombinación heteróloga que da como resultado integración aleatoria o no dirigida.

Producción

Vectores de expresión

- 45 Los "vectores de expresión" o "construcciones de expresión" se pueden utilizar para la transcripción de secuencias polinucleotídicas heterólogas, por ejemplo, las que codifican los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, y la traducción de su ARNm en una célula anfitriona adecuada. Este proceso también se denomina "expresión" de las moléculas de unión de la invención en el presente documento. Además de un origen de replicación, marcadores de selección y sitios de escisión de enzimas de restricción, los vectores de
- 50 expresión incluyen típicamente una o más secuencias reguladoras conectadas operablemente al polinucleótido heterólogo que se va a expresar.

El término "secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico necesaria para la expresión de una secuencia codificante conectada operablemente de un polinucleótido (heterólogo) en un organismo anfitrión particular y, por tanto, incluye secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales. Típicamente, las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de secuencias polinucleotídicas heterólogas en procariotas incluyen uno o varios promotores, opcionalmente una o varias secuencias operadoras, y uno o varios sitios de unión a ribosomas. En eucariotas, se requieren típicamente promotores, señales de poliadenilación, potenciadores y opcionalmente señales

de corte y empalme. Por otra parte, también se pueden introducir señales de inicio y secretoras específicas en el vector con el fin de permitir la secreción del polipéptido de interés al medio de cultivo.

Un ácido nucleico está "conectado operablemente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico, en particular en la misma molécula de polinucleótido. Por ejemplo, un promotor está conectado operablemente con una secuencia codificante de un gen heterólogo cuando es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia codificante. El promotor se coloca típicamente aguas arriba del gen que codifica el polipéptido de interés y regula la expresión del gen.

Las secuencias reguladoras ilustrativas para la expresión en células anfitrionas de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos (véase los documentos U.S. 5.168.062 de Stinski; U.S. 4.510.245 de Bell et al.; U.S. 4.968.615 de Schaffner et al). Como se ha expuesto anteriormente, los vectores de expresión también pueden incluir orígenes de replicación y marcadores seleccionables.

Como se ha mencionado anteriormente, los vectores de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más marcadores de selección. Los marcadores de selección adecuados para su uso con células anfitrionas eucarióticas incluyen, sin limitación, los genes de timidina quinasa (tk) del virus del herpes simplex, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (hgprt) y adenina fosforribosiltransferasa (aprt). Otros genes incluyen dhfr (resistencia a metotrexato), gpt (resistencia a ácido micofenólico), neo (resistencia a G-418) e hgro (resistencia a higromicina). La amplificación del vector puede utilizarse para aumentar los niveles de expresión. En general, el gen marcador de selección puede estar conectado directamente a las secuencias polinucleotídicas que se van a expresar, o ser introducido en la misma célula anfitriona por cotransformación.

En vista de lo anterior, la presente invención proporciona adicionalmente una o más de las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento insertadas en un vector. Por tanto, la invención proporciona particularmente vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de unión de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, conectados operablemente a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de unión y el dominio variable de la molécula de unión se puede clonar en tal vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

Célula anfitriona

En general, se puede emplear una variedad de células anfitrionas para expresar la molécula de unión de la invención a partir de un vector de expresión. Como se emplea en el presente documento, una "célula anfitriona" se refiere a una célula que puede ser o ha sido receptora de polinucleótidos o vectores o que codifica la molécula de unión de la presente invención. Específicamente, una célula anfitriona puede ser adicionalmente capaz de expresar y opcionalmente secretar dicha molécula de unión. En descripciones de procesos para obtener moléculas de unión a partir de células anfitrionas, los términos "célula" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente para indicar la fuente de una molécula de unión a menos que se especifique claramente lo contrario. El término "célula anfitriona" también incluye "líneas celulares anfitrionas".

En general, el término incluye células procarióticas o eucarióticas, y también incluye sin limitación bacterias, células de levadura, células de hongos, células vegetales y células animales tales como células de insecto y células de mamífero, p. ej., células murinas, de rata, de macaco o humanas.

Los polinucleótidos y/o vectores de la invención pueden introducirse en las células anfitrionas utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica, p. ej., mediante transfección, transformación o similares.

La "transfección" es el proceso de introducir deliberadamente moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluyendo vectores) en células diana. El término se utiliza principalmente para métodos no virales en células eucarióticas. La transducción se utiliza a menudo para describir la transferencia mediada por virus de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos. La transfección de células animales implica típicamente abrir poros u orificios transitorios en la membrana celular, para permitir la absorción de material. La transfección se puede llevar a cabo utilizando fosfato cálcico, mediante electroporación, mediante compresión celular o mediante mezcla de un lípido catiónico con el material para producir liposomas, que se fusionan con la membrana celular y depositan su carga en el interior. Las técnicas ilustrativas para transfectar células anfitrionas eucarióticas incluyen la captación mediada por vesículas lipídicas, la captación mediada por choque térmico, la transfección mediada por fosfato de calcio (coprecipitación de fosfato de calcio/ADN), microinyección y electroporación.

El término transformación se utiliza para describir la transferencia no viral de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluyendo vectores) en bacterias, y también en células eucarióticas no animales, incluyendo células vegetales. La transformación es por lo tanto la alteración genética de una célula bacteriana o eucariótica no animal que resulta de la captación directa a través de la membrana o membranas celulares desde sus alrededores y la

posterior incorporación de material genético exógeno (moléculas de ácido nucleico). La transformación se puede efectuar por medios artificiales. Para que ocurra la transformación, las células o bacterias deben estar en un estado de competencia, que podría aparecer como una respuesta limitada en el tiempo a condiciones ambientales tales como inanición y densidad celular. Para la transformación procariótica, las técnicas pueden incluir captación mediada por choque térmico, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, microinyección y electroporación. Las técnicas para la transformación de plantas incluyen transferencia mediada por *Agrobacterium*, tal como por *A. tumefaciens*, microproyectiles de tungsteno u oro impulsados rápidamente, electroporación, microinyección y captación mediada por polietilenglicol.

En vista de lo anterior, la presente invención proporciona adicionalmente células anfitrionas que comprenden al menos una secuencia de polinucleótidos y/o vector como se describe en el presente documento.

Para la expresión de la molécula de unión de la invención, se puede elegir una célula anfitriona que module la expresión de las secuencias de polinucleótidos insertadas, y/o modifique y procese el producto génico (es decir, ARN y/o proteína) según se desee. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos génicos pueden ser importantes para la función de la molécula de unión. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona y modificación de productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos del producto. Con este fin, se pueden utilizar células anfitrionas eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

Las células anfitrionas de mamífero ilustrativas que se pueden utilizar para expresar las moléculas de unión proporcionadas en el presente documento incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) que incluyen células CHO DHFR menos tales como DG44 y DUXBI 1 y como se describe en el documento U.S. 4.634.665 (p. ej., se utiliza con un marcador seleccionable DHFR, p. ej., como se describe en el documento U.S. 5.179.017), NSO, COS (un derivado de CV1 con antígeno T de SV40), HEK293 (riñón humano) y SP2 (mieloma de ratón). Otras líneas celulares anfitrionas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, HELA (carcinoma cervical humano), CV1 (línea de riñón de mono), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-IcIBPT (células endoteliales bovinas) y RAJI (linfocito humano). Las líneas celulares anfitrionas están disponibles típicamente en servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos de Tejidos o en la bibliografía publicada.

Las células que no son de mamífero tales como células bacterianas, de levadura, de insecto o vegetales también están fácilmente disponibles y en principio se pueden utilizar para la expresión de las moléculas de unión de la invención. Las células anfitrionas bacterianas ilustrativas incluyen enterobacteriáceas, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*.

Otras células anfitrionas incluyen células de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, y *Pichia pastoris*. Las células de insecto incluyen, sin limitación, células de *Spodoptera frugiperda*.

De acuerdo con lo anterior, los sistemas de expresión concebibles (es decir, células anfitrionas que comprenden un vector de expresión como se ha descrito anteriormente) incluyen microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti); o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5K de virus vaccinia).

Para la expresión de las moléculas de unión de la invención, se contemplan particularmente células eucarióticas. Por consiguiente, las células CHO que comprenden un vector eucariótico con una secuencia de polinucleótidos que codifica la molécula de unión de la invención (que puede, por ejemplo, estar conectada operablemente al promotor inmediato-temprano principal (MIEP) de citomegalovirus humano (CMV)) son sistemas de expresión útiles para producir las moléculas de unión de la invención.

Cultivo

Las células anfitrionas que albergan el vector de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las moléculas de unión descritas en el presente documento, en particular cadenas ligeras y cadenas pesadas como se describe en otra parte del presente documento, y se someten a ensayo para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Por tanto, la invención incluye células anfitrionas que contienen un polinucleótido que codifica una molécula de unión de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, conectadas operablemente a un promotor. Para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesada como ligera pueden coexpresarse en la célula anfitriona para la expresión de la molécula completa.

Purificación

Una vez que una molécula de unión de la invención se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse mediante cualquier método de purificación conocido en la técnica, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico (p. ej., cromatografía de hidroxilapatita), cromatografía de afinidad, particularmente cromatografía de afinidad de proteína A, proteína G o lectina, cromatografía en columna de clasificación por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, cromatografía de interacción hidrófoba o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. El experto en la técnica podrá seleccionar fácilmente un método de purificación adecuado basándose en las características individuales de la molécula de unión que se va a recuperar.

- 10 En vista de lo anterior, la presente invención proporciona también por tanto un procedimiento para la producción de una molécula de unión según las reivindicaciones, que comprende cultivar una célula anfitriona como se define en el presente documento en condiciones que permitan la expresión de la molécula de unión y opcionalmente recuperar la molécula de unión producida a partir del cultivo.

Composición farmacéutica

- 15 La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión, según las reivindicaciones, ácido nucleico, vector y/o célula anfitriona de la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica preferida comprende un anticuerpo de la invención y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 20 En un aspecto, la invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, un anticuerpo anti-FX1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en las reivindicaciones. Por consiguiente, también se prevé en el presente documento el uso de dichos anticuerpos para la fabricación de una composición farmacéutica. El término "composición farmacéutica" se refiere particularmente a una composición adecuada para administrar a un ser humano. Sin embargo, las composiciones adecuadas para la administración a animales no humanos también están englobadas por el término.

- 25 La composición farmacéutica y sus componentes (es decir, agentes activos y opcionalmente excipientes) son preferiblemente farmacéuticamente aceptables, es decir, capaces de provocar el efecto terapéutico deseado sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención pueden ser en particular estériles y/o farmacéuticamente inertes. Específicamente, el término "farmacéuticamente aceptable" puede significar aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea reconocida
30 generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

- La molécula de unión según las reivindicaciones está presente preferiblemente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de la molécula de unión que provoca el efecto terapéutico deseado. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y DL₅₀ (la dosis letal para 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la razón, DE₅₀/DL₅₀. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran índices terapéuticos grandes.

Como se ha expuesto anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más excipientes y/o agentes activos adicionales.

- 40 Los anticuerpos y fragmentos de los mismos se administran generalmente por vía parenteral, y particularmente por vía intravenosa (inyección o infusión) o subcutánea. Las composiciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitación, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos pueden elegirse del grupo que consiste en agua, soluciones emulsiones
45 o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados tales como, sin limitación, solución salina tamponada con fosfato. Los vehículos parenterales incluyen adicionalmente solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites no volátiles. Otros portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica. La molécula de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, según la presente invención se puede combinar con un portador,
50 diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables tales como los comentados anteriormente para formar una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender la molécula de unión de la presente invención en un portador acuoso que comprende un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en un tampón de histidina, tampón de ácido acético, tampón de ácido cítrico y un tampón de histidina/HCl. Los tampones adicionales y la información de formulación están disponibles para un experto en la técnica, por ejemplo, en Wang W et al., J. Pharmaceutical Sci. enero de 2007 (1):1-26. También pueden estar presentes conservantes tales como, por
55 ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente portadores proteicos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. En una realización, la composición

farmacéutica comprende la molécula de unión en forma liofilizada y preferiblemente se reconstituye en solución o suspensión antes de su administración. En otra realización, la composición farmacéutica comprende la molécula de unión y está en forma líquida.

- Después de que se hayan preparado las composiciones farmacéuticas de la invención y opcionalmente un excipiente adecuado, se pueden colocar en un recipiente apropiado y marcar para el tratamiento de una afección indicada. Tal marcaje incluiría, por ejemplo, la cantidad, frecuencia y método de administración.

Agentes activos adicionales

- Otro objeto de la presente invención son medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la invención y uno o varios principios activos adicionales, en particular para el tratamiento y/o la profilaxis de los trastornos mencionados en el presente documento. Los ejemplos preferidos de ingredientes activos adecuados para las combinaciones incluyen:

- sustancias que reducen los lípidos, especialmente inhibidores de la reductasa de HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A), incluyendo sin limitación lovastatina (Mevacor), simvastatina (Zocor), pravastatina (Pravachol), fluvastatina (Lescol) y atorvastatina (Lipitor);
- Agentes terapéuticos/vasodilatadores coronarios, especialmente inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina), incluyendo sin limitación captopril, lisinopril, enalapril, ramipril, cilazapril, benazepril, fosinopril, quinapril y perindopril, o antagonistas de receptores de AII (angiotensina II), incluyendo sin limitación embusartan, losartan, valsartan, irbesartan, candesartán, eprosartan y temisartan, o antagonistas de adrenoceptores, incluyendo sin limitación carvedilol, alprenolol, bisoprolol, acebutolol, atenolol, betaxolol, carteolol, metoprolol, nadolol, penbutolol, pindolol, propranolol y timolol, o antagonistas de adrenoceptores alfa-1, incluyendo sin limitación prazosina, bunazosina, doxazosina y terazosina, o diuréticos, incluyendo sin limitación hidroclorotiazida, furosemida, bumetanida, piretanida, torasemida, amilorida y dihidralazina, o bloqueadores de los canales de calcio, incluyendo sin limitación verapamilo y diltiazem, o derivados de dihidropiridina, incluyendo sin limitación nifedipina (Adalat) y nitrendipina (Bayotensina), o preparaciones con nitrógeno, incluyendo sin limitación 5-mononitrato de isosorbida, dinitrato de isosorbida y trinitrato de glicerol, o sustancias que provocan un aumento en monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), incluyendo sin limitación estimuladores de guanilato ciclasa soluble, incluyendo sin limitación riociguat;
- activadores del plasminógeno (trombolíticos/fibrinolíticos) y compuestos que promueven la trombolisis/fibrinólisis incluyendo sin limitación inhibidores del inhibidor del activador del plasminógeno (inhibidores de PAI) o inhibidores del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (inhibidores de TAFI), incluyendo sin limitación activador del plasminógeno tisular (t-PA), estreptoquinasa, reteplasa y uroquinasa;
- sustancias anticoagulantes (anticoagulantes), incluyendo sin limitación heparina (UFH), heparinas de bajo peso molecular (LMW), incluyendo sin limitación tinzaparina, certoparina, parnaparina, nadroparina, ardeparina, enoxaparina, reviparina, dalteparina, danaparoide, semuloparina (AVE 5026), adomiparina (M118) y EP-42675/ORG42675;
- inhibidores directos de la trombina (DTI), incluyendo sin limitación Pradaxa (dabigatrán), atecegratrán (AZD-0837), DP-4088, SSR-182289A, argatrobán, bivalirudina y tanogitrán (BIBT-986 y profármaco BIBT-1011), hirudina;
- inhibidores directos del factor Xa incluyendo sin limitación, rivaroxabán, apixabán, edoxabán (DU-176b), betrixabán (PRT-54021), R-1663, darexabán (YM-150), otamixabán (FXV-673/RPR-130673), letaxabán (TAK-442), razaxabán (DPC-906), DX-9065a, LY-517717, tanogitrán (BIBT-986, profármaco: BIBT-1011), idraparinax y fondaparinux;
- sustancias inhibidoras de la agregación plaquetaria (inhibidores de la agregación plaquetaria, inhibidores de la agregación de trombocitos), incluyendo, sin limitación, ácido acetilsalicílico (por ejemplo, aspirina), ticlopidina (ticlid), clopidogrel (plavix), prasugrel, ticagrelor, cangrelor, elinogrel, vorapaxar;
- antagonistas de receptores de fibrinógeno (antagonistas de glucoproteína IIb/IIIa), incluyendo sin limitación abciximab, eptifibatida, tirofiban, lamifiban, lefradafiban y fradafiban;
- antiarrítmicos;
- varios antibióticos o medicamentos antifúngicos, bien sea como terapia calculada (antes de la presencia del diagnóstico microbiano) o como terapia específica;
- vasopresores, incluyendo sin limitación norepinefrina, dopamina y vasopresina;
- terapia inotrópica, incluyendo sin limitación dobutamina;

- proteína C activada humana recombinante, por ejemplo, Xigris;
 - productos sanguíneos, incluyendo sin limitación productos concentrados de eritrocitos, productos concentrados de trombocitos, eritropoyetina y plasma fresco congelado.
- 5
- inhibidores de la adhesión plaquetaria como antagonistas de GPVI y/o GPIb incluyendo sin limitación Revacept o Caplacizumab;
 - inhibidores de las vías de transducción de señales dependientes de VEGF y/o PDGF incluyendo, sin limitación, Aflibercept, Ranibizumab, Bevacizumab, KH-902, Pegaptanib, Ramucirumab, Escualamina o Bevasiranib, Apatinib, Axitinib, Brivanib, Cediranib, Dovitinib, Lenvatinib, Linifanib, Motesanib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib, Tivozanib, Vandetanib, Vatalanib, Vargatef o E-10030;
- 10
- inhibidores de la ruta de transducción de señales de angiopoyetina-Tie incluyendo sin limitación AMG386;
 - inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor Tie2;
 - inhibidores de las rutas de transducción de señales dependientes de integrina incluyendo, sin limitación, Volociximab, Cilengitid o ALG1001;
- 15
- los inhibidores de la transducción de señales dependiente de la PI3Quinasa-AKT-mTor, incluyendo, sin limitación, XL-147, Perifosina, MK2206, Sirolimus, Temsirolimus o Everolimus;
 - Corticosteroides incluyendo sin limitación hidrocortisona, fludrocortisona, Anecortave, Betametasona, Dexametasona, Triamcinolona, Fluocinolona o Acetónido de Fluocinolona;
 - inhibidores de la ruta de transducción de señales dependiente de ALK1-Smad1/5 incluyendo sin limitación ACE041;
 - inhibidores de Ciclooxygenasas incluyendo sin limitación bromfenaco o nepafenaco;
- 20
- inhibidores del sistema Calicreína-Cinina incluyendo sin limitación Safotibant o Ecallantida;
 - inhibidores de las vías de transducción de señales dependientes de esfingosina-1-fosfato incluyendo sin limitación Sonopizumab;
 - inhibidores del receptor del complemento C5a incluyendo, sin limitación, Eculizumab;
 - inhibidores del receptor 5HT1a incluyendo, sin limitación, Tandospirona;
- 25
- inhibidores de la ruta de transducción de señales dependiente de Raf-Mek-Erk, inhibidores de la ruta de transducción de señales de MAPK; inhibidores de la ruta de transducción de señales de FGF, inhibidores de la proliferación de células endoteliales; y compuestos que pueden inducir apoptosis; o
 - Terapias fotodinámicas, que consisten en una sustancia activa y la exposición a la luz, mientras que la sustancia activa es, por ejemplo, Verteporfina.
- 30
- Por "combinaciones" se entienden en el sentido de la invención tanto formas de dosificación que contienen todos los componentes (las denominadas combinaciones fijas) como paquetes de combinación que contienen los componentes separados entre sí, como también componentes que se administran de manera simultánea o secuencial, siempre que se utilicen para la profilaxis y/o el tratamiento de la misma enfermedad. Asimismo, es posible combinar dos o más principios activos entre sí, lo que significa que están presentes en combinaciones de dos o más componentes.
- 35
- Administración**
- Es aplicable una variedad de vías para la administración de la composición farmacéutica según la presente invención. Típicamente, la administración se realizará parenteralmente. Los métodos de suministro parenteral incluyen administración tópica, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intrauterina, intravaginal, sublingual o intranasal.
- 40
- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de compuestos activos. Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Adicionalmente,
- 45
- las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos ilustrativos incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también

puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Para la administración tópica o nasal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera particular que se vaya a atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre técnicas para formulación y administración en la 22ª edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Mack Publishing Co, Easton, PA, 2012).

Tratamiento

El término "tratamiento" en todas sus formas gramaticales incluye el tratamiento terapéutico o profiláctico de las enfermedades descritas en el presente documento. Un "tratamiento terapéutico o profiláctico" comprende tratamientos profilácticos dirigidos a la prevención completa de manifestaciones clínicas y/o patológicas o tratamiento terapéutico dirigido a la mejora o remisión de manifestaciones clínicas y/o patológicas. El término "tratamiento" por tanto también incluye la mejora o prevención de las enfermedades descritas.

Los términos "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas y similares.

Dosificación

La dosificación exacta de la molécula de unión, polinucleótido, vector o célula anfitriona será determinable por un experto en la técnica utilizando mecanismos conocidos. Las dosificaciones adecuadas proporcionan cantidades suficientes de la molécula de unión y son preferiblemente terapéuticamente eficaces, es decir, provocan el efecto terapéutico deseado.

Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para el propósito del tratamiento (p. ej., mantenimiento de la remisión frente al brote agudo de la enfermedad), vía, tiempo y frecuencia de administración, tiempo y frecuencia de la formulación de administración, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, gravedad del estado de la enfermedad, combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Los intervalos de dosificación adecuados se pueden determinar utilizando datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales y preferiblemente incluyen la DE₅₀. Típicamente, las cantidades de dosificación pueden variar de 0,1 a 100000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 2 g, dependiendo de la vía de administración. Las dosificaciones ilustrativas de la molécula de unión están en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. En la bibliografía se proporcionan directrices sobre dosificaciones y métodos de suministro particulares. Se reconoce que el tratamiento puede requerir una única administración de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz de la molécula de unión, polinucleótido, vector o célula anfitriona de la invención. Por ejemplo, algunas composiciones farmacéuticas podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas, o una vez en un mes dependiendo de la formulación, semivida y tasa de aclaramiento de la formulación particular.

Kit

La invención se refiere adicionalmente a envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes o viales llenos con uno o más de los agentes activos de las composiciones farmacéuticas de la invención mencionadas anteriormente. Por tanto, también se proporciona en el presente documento un kit que comprende una molécula de unión, según las reivindicaciones, un polinucleótido, un vector, una célula anfitriona y/o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Los kits anteriormente mencionados descritos en el presente documento pueden utilizarse para el tratamiento de las enfermedades expuestas en otra parte del presente documento, o para otros fines.

Asociado con el envase o los envases mencionados anteriormente puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración humana.

El kit puede comprender uno o más agentes activos (formulados opcionalmente como composiciones farmacéuticas con uno o más excipientes). Los agentes activos adecuados se han enumerado previamente en el contexto de la composición farmacéutica y también son concebibles como partes del kit de la invención. El agente activo adicional puede administrarse simultáneamente o secuencialmente al paciente con respecto a la molécula de unión, secuencia de ácido nucleico, vector, célula anfitriona y/o la composición farmacéutica. La presente invención abarca adicionalmente la administración de los agentes activos a través de diferentes vías, p. ej., por vía oral e intravenosa.

En el presente documento se contemplan adicionalmente kits que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican las moléculas de unión de la invención. Dichos polinucleótidos se proporcionan típicamente en un vector, tal como un plásmido, adecuado para la transfección a, y la expresión por, una célula anfitriona. Tales vectores y células anfitrionas se describen en otra parte en el presente documento.

Uso terapéutico

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según las reivindicaciones para su uso como medicamentos para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades en seres humanos y/o animales.

- 5 La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno según las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos, en particular trastornos cardiovasculares, preferiblemente trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas.

10 El factor XIa (FXIa) es una enzima importante en el contexto de la coagulación, que puede ser activado tanto por trombina como por factor XIIa (FXIIa), y por lo tanto está implicado en dos procesos esenciales de coagulación: es un componente central de la transición desde el inicio a la amplificación y propagación de la coagulación: en bucles de retroalimentación positiva, la trombina activa, además del factor V y el factor VIII, también el factor XI al factor XIa, mediante lo cual el factor IX se convierte en el factor IXa, y, a través del complejo factor IXa/factor VIIIa generado de esta manera, el factor X se activa y, por lo tanto, la formación de trombina a su vez se estimula altamente, lo que conduce a un fuerte crecimiento de trombos y estabilización del trombo.

15 Por otra parte, el factor XIa es un componente importante para la iniciación intrínseca de la coagulación: Además de la estimulación a través del factor tisular (TF), el sistema de coagulación puede activarse también particularmente en superficies cargadas negativamente, que incluyen no sólo estructuras superficiales de células foráneas (p. ej., bacterias) sino también superficies artificiales tales como prótesis vasculares, endoprótesis vasculares y circulación extracorpórea. En la superficie, inicialmente el factor XII (FXII) se activa al factor XIIa (FXIIa) que posteriormente activa el FXI, anclado a las superficies celulares, a FXIa. Esto conduce a una activación adicional de la cascada de coagulación como se ha descrito anteriormente.

20 Por el contrario, la generación de trombina en la fase de inicio sigue sin ser influida por la activación de TF/factor VIIa y factor X y finalmente se forma de trombina, la reacción fisiológica en lesiones vasculares. Esto podría explicar por qué no se encontraron prolongaciones de los tiempos de hemorragia en ratones con FXIa inactivado, como en conejos y otras especies, con la administración del inhibidor de FXIa. Esta baja tendencia a hemorragia causada por la sustancia tiene una gran ventaja para su uso en seres humanos, particularmente en pacientes con mayor riesgo de hemorragia.

Por consiguiente, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según las reivindicaciones, se utilizan en el tratamiento y/o profilaxis de trastornos o complicaciones que pueden surgir de la formación de coágulos.

30 En el sentido de la presente invención, los "trastornos trombóticos o tromboembólicos" comprenden trastornos que se presentan tanto en la vasculatura arterial como en la venosa y que pueden tratarse con los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según las reivindicaciones, en particular trastornos en las arterias coronarias del corazón, tales como síndrome coronario agudo (SCA), infarto de miocardio con elevación de segmento ST (IMEST) y sin elevación de segmento ST (no-IMEST), angina de pecho estable, angina de pecho inestable, reoclusiones y restenosis tras intervenciones coronarias tales como angioplastia, implantación de endoprótesis o bypass aortocoronario, pero también trastornos trombóticos o tromboembólicos en otros vasos que conducen a trastornos oclusivos arteriales periféricos, embolias pulmonares, tromboembolias venosas, trombosis venosas, en particular en venas de pierna profunda y venas renales, ataques isquémicos transitorios y también accidente cerebrovascular trombótico y accidente cerebrovascular tromboembólico.

40 La estimulación del sistema de coagulación puede producirse por diversas causas o trastornos asociados. En el marco de intervenciones quirúrgicas, inmovilidad, confinamiento en cama, infecciones, inflamación o cáncer o terapia contra el cáncer, entre otras cosas, el sistema de coagulación puede estar muy activado y pueden presentarse complicaciones trombóticas, en particular trombosis venosas. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por lo tanto, se utilizan en la profilaxis de trombosis en el contexto de intervenciones quirúrgicas, por ejemplo, en pacientes que padecen cáncer o pacientes que reciben una cirugía ortopédica, como sustitución de cadera o rodilla. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por lo tanto, también se utilizan en la profilaxis de trombosis en pacientes que tienen un sistema de coagulación activado, por ejemplo, en las situaciones de estimulación descritas.

45 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por lo tanto, también se utilizan en el tratamiento y/o profilaxis de tromboembolias cardiogénicas, por ejemplo isquemias cerebrales, apoplejía y tromboembolias sistémicas e isquemias, en pacientes con arritmias cardíacas agudas, intermitentes o persistentes, por ejemplo fibrilación auricular, y en pacientes que experimentan cardioversión, y también en pacientes con trastornos de las válvulas cardíacas o con válvulas cardíacas artificiales.

50 Por otra parte, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se utilizan en el tratamiento y/o profilaxis de la coagulación intravascular diseminada (CID) que puede producirse en relación con la septicemia, entre otros, pero también debido a intervenciones quirúrgicas, trastornos neoplásicos, quemaduras u otras lesiones y puede conducir a daño orgánico grave a través de microtrombosis.

Las complicaciones tromboembólicas se producen además en anemias hemolíticas microangiopáticas y por la entrada

de sangre en contacto con superficies extrañas en el contexto de la circulación extracorpórea, tales como, por ejemplo, hemodiálisis, OMEC ("oxigenación de membrana extracorpórea"), DAVI ("dispositivo de asistencia ventricular izquierda") y métodos similares, fístulas AV, prótesis de válvulas vasculares y cardíacas.

5 Por otra parte, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se utilizan en el tratamiento y/o profilaxis de trastornos que implican formación de micro-coágulos o depósitos de fibrina en los vasos sanguíneos cerebrales que pueden conducir a trastornos de demencia tales como demencia vascular o enfermedad de Alzheimer. En este caso, el coágulo puede contribuir al trastorno tanto a través de oclusiones como mediante la unión de factores relevantes para la enfermedad adicionales.

10 Por otra parte, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden utilizar para la profilaxis y/o el tratamiento de complicaciones trombóticas y/o tromboembólicas, tales como, por ejemplo, tromboembolias venosas en pacientes con cáncer, en particular aquellos que se someten a intervenciones quirúrgicas importantes o quimioterapia o radioterapia.

15 En el contexto de la presente invención, el término "hipertensión pulmonar" incluye hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar asociada con trastornos del corazón izquierdo, hipertensión pulmonar asociada con trastornos pulmonares y/o hipoxia e hipertensión pulmonar debido a tromboembolias crónicas (HPTEC).

Además, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, también se utilizan en el tratamiento y/o profilaxis de coagulación intravascular diseminada en el contexto de una enfermedad infecciosa, y/o de síndrome inflamatorio sistémico (SRIS), disfunción orgánica séptica, insuficiencia orgánica séptica e insuficiencia multiorgánica, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), choque séptico y/o insuficiencia orgánica séptica. En el curso de una infección, puede haber una activación generalizada del sistema de coagulación (coagulación intravascular diseminada o coagulopatía de consumo, en el presente documento denominada a continuación "CID") con microtrombosis en diversos órganos y complicaciones hemorrágicas secundarias. Por otra parte, puede haber daño endotelial con aumento de permeabilidad de los vasos y difusión de fluido y proteínas al espacio extravascular. A medida que progresa la infección, puede haber insuficiencia de un órgano (por ejemplo, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia respiratoria, déficit nervioso central e insuficiencia cardiovascular) o insuficiencia multiorgánica. En el caso de la CID, existe una activación masiva del sistema de coagulación en la superficie de las células endoteliales dañadas, las superficies de los cuerpos extraños o el tejido extravascular reticulado. Como consecuencia, hay coagulación en pequeños vasos de diversos órganos con hipoxia y disfunción orgánica posterior. Un efecto secundario es el consumo de factores de coagulación (por ejemplo, factor X, protrombina y fibrinógeno) y plaquetas, que reduce la coagulabilidad de la sangre y puede dar como resultado hemorragias pesadas.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos también se utilizan en la profilaxis primaria de trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o trastornos inflamatorios y/o trastornos con aumento de permeabilidad vascular en pacientes en los que las mutaciones génicas conducen a aumento de actividad de las enzimas, o aumento de niveles de zimógenos y estos se establecen mediante ensayos/mediciones relevantes de la actividad enzimática o concentraciones de zimógenos.

Además, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos también se pueden utilizar para prevenir la coagulación ex vivo, por ejemplo para la protección de órganos que se van a trasplantar contra daño de órgano provocado por la formación de coágulos y para proteger al receptor de órgano contra tromboembolias del órgano trasplantado, para conservar productos de sangre y plasma, para limpiar/pretratar catéteres y otros dispositivos auxiliares y aparatos médicos, para recubrir superficies sintéticas de dispositivos auxiliares y aparatos médicos utilizados in vivo o ex vivo o para muestras biológicas que pueden comprender factor XIa.

45 No según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona adicionalmente el uso de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se reivindica actualmente, el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente.

La presente divulgación no según la invención reivindicada proporciona adicionalmente el uso de las moléculas de unión de la invención, preferiblemente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente, preferiblemente para producir un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos trombóticos o tromboembólicos.

No según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona adicionalmente un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente, utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión de la invención, preferiblemente un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo.

55 La presente invención proporciona adicionalmente los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según las reivindicaciones, para su uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente, utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión de la invención, preferiblemente anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo.

No según la invención reivindicada, la presente divulgación proporciona adicionalmente métodos de tratamiento de trastornos tromboticos o tromboembolicos en el hombre y/o animales mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica. La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para inhibir la coagulación sanguínea, la agregación plaquetaria y/o la trombosis en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica.

Terapia génica

En el presente documento se proporciona adicionalmente un vector de transferencia para su uso en terapia génica de mamíferos que comprende un polinucleótido como se divulga en el presente documento, y métodos para tratar o prevenir una enfermedad que comprenden incorporar ácido nucleico exógeno como se describe en el presente documento a la célula de un paciente mamífero que lo necesita, de modo que se exprese el ácido nucleico exógeno y se prevenga o trate la enfermedad.

En una realización, se administran a un paciente las moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una cadena pesada como una cadena ligera. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico se administran de manera que se integren de manera estable en cromosomas de células B ya que estas células están especializadas para producir anticuerpos. En una realización, las células B precursoras se transfectan o infectan ex vivo y se retransplantan a un paciente que lo necesita. En otra realización, las células B precursoras u otras células se infectan in vivo utilizando un virus recombinante conocido por infectar el tipo celular de interés.

En una realización preferida, el método de terapia génica comprende administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-FXI como se divulga en el presente documento y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra realización preferida, el método de terapia génica comprende administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-FXI como se divulga en la presente memoria y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra realización, el método de terapia génica comprende administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o la porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-FXI como se divulga en el presente documento y expresar la molécula de ácido nucleico.

Las condiciones específicas para la absorción de ácido nucleico exógeno son bien conocidas en la técnica. Incluyen, pero no se limitan a, infección retroviral, infección adenoviral, transformación con plásmidos, transformación con liposomas que contienen ácido nucleico exógeno, suministro biolístico de ácido nucleico (es decir, carga del ácido nucleico en oro u otras partículas metálicas y disparo o inyección a las células), infección por virus adenoasociado e infección por virus de Epstein-Barr. Todos estos pueden considerarse "vectores de expresión" para los fines de la invención.

Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos o vectores que se integran en un genoma anfitrión. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional conectado operablemente al ácido nucleico exógeno. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. En una realización preferida, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y detención transcripcionales.

Además, el vector de expresión puede comprender elementos adicionales. Por ejemplo, para integrar vectores de expresión, el vector de expresión contiene al menos una secuencia homóloga al genoma de la célula anfitriona, y preferiblemente dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. El vector de integración puede dirigirse a un locus específico en la célula anfitriona seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Las construcciones para integrar vectores son bien conocidas en la técnica.

Experimentos

Partiendo del anticuerpo anti-FXI murino 1A6, se generaron nuevos anticuerpos humanizados (véase el Experimento 1). Con el fin de reducir adicionalmente el potencial de inmunogenicidad inherente, estos anticuerpos se sometieron a optimización de secuencia en las regiones CDR como se describe a continuación (experimento 2). Se sometieron a prueba anticuerpos candidatos para determinar su actividad de unión a FXI determinada mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y por su capacidad para inhibir la conversión de FXI en su forma activa, FXIa (Experimentos 4 y 5). Para dos anticuerpos ilustrativos, a saber, TPP-3290 y TPP-3238, los valores de CE50 para ensayos de ELISA y conversión se muestran en la Figura 9. Obviamente, los valores de CE50 son comparables a los de 1A6, por lo que esos dos anticuerpos parecen ser candidatos valiosos para una exploración adicional. Por lo tanto, para confirmar la comparabilidad con 1A6, los anticuerpos TPP-3290 y TPP-3238 se sometieron a prueba en el modelo de trombosis de babuino in vivo descrito en el Experimento 10. Sorprendentemente, utilizando regímenes de dosificación farmacológica razonables, estos dos anticuerpos no mostraron ninguna actividad antitrombótica. No se pudo detectar para ninguna de las dos moléculas reducción en la formación de trombos inducida por colágeno. En el

seguimiento de este experimento in vivo, estos anticuerpos se analizaron en el sistema de prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT) basado en plasma. Este tipo de análisis reconfirma los datos in vivo de manera que para ambos anticuerpos sólo se observó un efecto bloqueante muy bajo o incluso ningún efecto bloqueante (Experimento 6 y Figura 8). Por tanto, a pesar de que los anticuerpos TPP-3290 y TPP-3238 tienen valores de CE50 casi idénticos en los ensayos de ELISA y conversión en comparación con el anticuerpo 1A6 (véase la figura 9) no muestran un efecto antitrombótico in vivo. No hay explicación fácilmente disponible de por qué los valores comparables de los ensayos ELISA y de conversión de 1A6 no se traducen en actividad antitrombótica in vivo o prolongación de aPTT.

Sin embargo, otras alteraciones de secuencia conducen a los anticuerpos TTP-3583 y TTP-3577. Estos dos anticuerpos exhibieron excelentes afinidades de unión al FXI diana (Experimento 3, Figuras 3 y 4, Figura 9). Además, los anticuerpos TTP-3583 y TTP-3577 bloquean eficazmente la conversión de FXI en su forma activa FXIa (Experimento 5 y Figuras 7 y 8). Sorprendentemente, los anticuerpos TTP-3583 y TTP-3577 prolongan el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT) a concentraciones comparables a 1A6 o, en el caso de TPP-3583, a concentraciones incluso más bajas (Experimento 6 y Figura 9). Así, se han generado dos anticuerpos que en los ensayos bioquímicos con respecto a su actividad de unión son comparables a la variante de partida murina 1A6. El TPP-3583 mostró incluso una actividad ligeramente mayor en el ensayo de aPTT basado en plasma.

Esto también se confirmó mediante la actividad antitrombótica de TPP-3583 en el modelo in vivo (véase el Experimento 9). Por tanto, con la provisión de anticuerpos TPP-3583 y TPP-3577, la invención proporciona anticuerpos humanizados y de línea germinal que son ambos eficaces y se espera que sean seguros para el tratamiento, tanto en términos de inmunogenicidad reducida como de minimización del riesgo de hemorragia. Los anticuerpos evaluados en el presente documento son por lo tanto nuevos agentes prometedores para tratamiento y/o profilaxis eficaces de trastornos tromboticos o tromboembolicos y/o complicaciones tromboticas o tromboembolicas.

Experimento 1: Humanización de anticuerpos murinos

La humanización del anticuerpo murino 1A6 se realizó utilizando técnicas convencionales.

En detalle, para la selección de subconjuntos de familias aceptoras de línea germinal, se determinaron y anotaron restos de CDR del anticuerpo murino siguiendo el sistema de numeración de Kabat (para detalles véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum>). Las estructuras canónicas de las CDR de cadena pesada y ligera se determinaron basándose en las siguientes publicaciones:

- O'Brien y Jones, Humanising Antibodies by CDR Grafting, Capítulo 40; Antibody Engineering, Parte de la serie Springer Lab Manuals pág. 567-590; R. Kontermann et al. (eds.), Antibody Engineering; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001.
- Hwang, Almagro, Buss, Tan, y Foote (2005) Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. Methods, mayo; 36(1):35-42.

Basándose en estas publicaciones, se seleccionaron aceptores de marco de la línea germinal humana con las mismas estructuras canónicas.

En una siguiente etapa, se identificaron restos que soportaban estructuras de bucle e interfases VH así como VL basándose en el sistema de numeración de Kabat (para detalles véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum>). Siempre que sea necesario, los aminoácidos que son importantes para la conformación del bucle y para las interfases VH y VL se retromutaron.

Se analizaron las identidades y similitudes con cada secuencia marco de la línea germinal humana individual dentro de los mismos subconjuntos canónicos y se identificó la secuencia de la línea germinal con la mejor homología global con las secuencias VH y VL murinas utilizando el programa Align X del paquete Vector NTI. Estas secuencias se seleccionaron como marco de línea germinal humana aceptor para injertar CDR de VH y VL, respectivamente.

La región de unión de la cadena pesada humana (región JH) así como la región VL humana se seleccionaron basándose en la mejor homología de secuencia.

Con el fin de analizar estas variantes humanizadas diseñadas in silico para la actividad de unión a FXI, se sintetizaron los ADNc correspondientes y se utilizaron para la expresión de los anticuerpos humanizados. Para ello, se transfectoron células HEK293 con los ADNc y, después de 5 días de cultivo, se purificaron los anticuerpos del sobrenadante de estas células. Cada anticuerpo humanizado purificado se caracterizó por su actividad de unión utilizando un protocolo ELISA convencional y por sus propiedades fisicoquímicas analizando las moléculas por cromatografía de exclusión por tamaño.

Experimento 2: Mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal y optimización de secuencias de CDR

Para una reducción adicional del riesgo de inmunogenicidad intrínseca, en una etapa siguiente se realizó la mutación inversa de anticuerpos a secuencias de la línea germinal y optimización de la secuencia de las CDR del anticuerpo

humanizado.

Por lo tanto, se intercambiaron aminoácidos que diferían de la secuencia de la línea germinal más cercana, se sintetizaron los ADNc correspondientes, se transfectaron transitoriamente células HEK293, se cuantificaron los anticuerpos expresados de esta invención y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para unirse a FXI humano (Haematologic Technologies Inc.; human FXI; Núm. de Cat. HCXI-0150).

Experimento 3: Expresión y cuantificación de variantes de anticuerpos.

Las IgG mencionadas anteriormente se expresaron transitoriamente en células de mamífero como describen Tom et al., Capítulo 12 en Methods Express: Expression Systems editado por Micheal R. Dyson y Yves Durocher, Scion Publishing Ltd, 2007. En resumen, un plásmido de expresión basado en el promotor de CMV se transfectó en células HEK293-6E y se incubó en matraces Fernbach o bolsas Wave. Las células transfectadas se cultivaron a 37°C durante 5 a 6 días en medio F17 (Invitrogen). Se añadió un suplemento de Ultra-Low IgG FCS (Invitrogen) al 1% y ácido valproico 0,5 mM (Sigma) 24 h después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de proteína A y se caracterizaron adicionalmente por su afinidad de unión utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Véanse las tablas 1 y 2 más adelante para las secuencias de los anticuerpos de la invención. La Tabla 3 más adelante enumera las secuencias de anticuerpos adicionales.

Experimento 4: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):

ELISA

Se utilizó un formato ELISA convencional para analizar la afinidad de unión de los anticuerpos de esta invención a FXI. El FXI humano se obtuvo de Haematologic Technologies Inc. (Human FXI; Núm. de Cat. HCXI-0150), el FXI de babuino se generó como se describe a continuación. Estos antígenos se aplicaron como recubrimiento sobre placas de microtitulación Maxisorp de 384 pocillos de color negro (Nunc; Núm. de Cat.: 460518), se diluyeron a una concentración de 1 µg/ml en Tampón de Recubrimiento 1X (Candor Bioscience; Núm. de Cat. 121125). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Después de la incubación durante la noche, las placas se lavaron 2 X con 50 µl/pocillo utilizando Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS, Sigma Aldrich, Núm. de Cat. D8662) + Tween 20 al 0,05% (Sigma Aldrich, Núm. de Cat. P9416). Después de esto, se añadieron 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo (Smart Block; Candor Bioscience; Núm. de Cat. 113500) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron 3 X utilizando 50 µl/pocillo de un tampón PBS + Tween 20 al 0,05%. Los anticuerpos de esta invención se añadieron a diferentes concentraciones a un volumen final de 30 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta etapa de incubación, las placas se lavaron 3 X utilizando 50 µl/pocillo de un tampón PBS + Tween 20 al 0,05%. Para la detección de anticuerpos candidatos unidos, se diluyó el anticuerpo anti-h-Fc-POD (Sigma; Núm. de Cat. A0170) por el factor de 1:10000 en Tampón de Bloqueo al 10%. Se añadieron 30 µl/pocillo de este anticuerpo de detección diluido y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta etapa de incubación, las placas se lavaron 3 X utilizando 50 µl/pocillo de un tampón PBS + Tween 20 al 0,05%. Como sustrato, se añadió una mezcla de 30 µl/pocillo de rojo Amplex diluido 1:1000 (Invitrogen; Núm. de Cat. 12222; solución de partida 10 mM en DMSO) y 1:10000 de peróxido de hidrógeno (Merck; Núm. de Cat. 107209; solución de partida al 30%) y las placas se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad.

Para la medición, se usó el lector Infinite f500 (Tecan).

Modo de medición:

- Fluorescencia
- Lectura superior
- Ex 535 nm
- Em 590 nm

Los datos se analizaron utilizando el soporte lógico GraphPadPrism, la actividad de unión de esta invención se calculó como valores de CE50. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado, los datos se proporcionan como media ± ETM. Los datos para ELISA de FXI humano para los anticuerpos 1A6, TPP-3583, TPP-3577, TPP-3290 y TPP-3238 se muestran en las Figuras 2-6 y los datos numéricos en la Figura 9. La forma de las curvas, así como los valores de CE50, son comparables a 1A6 y, por lo tanto, se clasifican para análisis adicionales.

Análisis del dominio de unión mediante ELISA competitivo

Para demostrar que las variantes humanizadas y optimizadas aún se unen al mismo dominio que la variante de partida 1A6, se utilizó ELISA competitivo. Para esto, se biotiniló 1A6 utilizando el Kit de biotinilación de NHS-PEG4 EZ-Link™ (ThermoFischer Scientific, Núm. de Cat. 21455) según las instrucciones del fabricante. Como se ha descrito anteriormente, FXI se aplicó como recubrimiento y se añadió una concentración fija de 1A6 biotinilado mezclado con diferentes concentraciones de los anticuerpos de esta invención. La unión de 1A6 biotinilado se detectó utilizando

estreptavidina conjugada con HRP (Sigma Aldrich, Núm. de Cat. S5512). Como sustrato, se añadió una mezcla de 30 µl/pocillo de rojo Amplex diluido 1:1000 (Invitrogen; Núm. de Cat. 12222; solución de partida 10 mM en DMSO) y peróxido de hidrógeno 1:10000 (Merck; Núm. de Cat. 107209; solución de partida al 30%) y las placas se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad. La unión de los anticuerpos de la invención al mismo dominio que 1A6 conduce al desplazamiento de este último aumentando las concentraciones de las variantes humanizadas y optimizadas. Este efecto se ha mostrado para todos los anticuerpos descritos en esta invención. Como ejemplo, los datos del ensayo de unión competitiva de TPP-3583 y 1A6 se muestran en la Figura 7 indicando que estos dos anticuerpos se unen al mismo dominio en la molécula de FXI.

Generación de FXI de babuino

Se sintetizó ADNc para FXI Papio anubis (Núm. de Acceso Uniprot A0A096NC95) y clonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1(+) (ThermoFisher Scientific, Núm. de Cat. V790-20). Para la expresión y purificación, se transfectaron transitoriamente células HEK293 utilizando el reactivo Lipofectamine LTX con Reactivo PLUS (Invitrogen, Núm. de Cat. A12621) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión recombinante de FXI de babuino se analizó mediante SDS-PAGE. Las actividades de unión de los anticuerpos descritos en esta invención para la unión de FXI de babuino se muestran en la Figura 9.

Experimento 5: Neutralización funcional de la conversión de FXI en su forma activa, FXIa, por anticuerpos de esta invención.

Para probar la inhibición de la conversión de FXI (Haematologic Technologies, Inc., número de catálogo HCXIA-0150) en su forma activa FXIa por FXIa, se incubaron 10 nM de FXI humano en Tris 50 mM/HCl, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM y BSA al 0,1% con diferentes concentraciones de los anticuerpos durante 1 hora a 37°C. En una siguiente etapa, se añadió FXIa humano (Enzyme Research, número de catálogo HFXIIa 1212a) a una concentración final de 1 unidad/mg y se incubó durante 24 horas a 37°C. A continuación, se añadieron Inhibidor de Tripsina de Maíz (Enzyme Research, CTI) a una concentración final de 200 nM y el sustrato fluorogénicamente marcado (I-1575, Bachem, concentración final 25 µM). La fluorescencia se controló continuamente a 360/465 nm utilizando un Lector SpectraFluorplus (Tecan). Los datos se analizaron utilizando el soporte lógico GraphPadPrism. Los datos se proporcionan como media ± ETM, n = 4 (véase el gráfico para TPP-3583 en la Figura 8, los valores numéricos para otros anticuerpos se enumeran en la Figura 9).

Experimento 6: Tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)

Se incubaron alícuotas de plasma humano con concentraciones crecientes de los anticuerpos de esta invención durante 3 min a 37°C. Para iniciar la ruta de coagulación intrínseca, se incubaron 0,05 ml de plasma con 0,05 ml de reactivo aPTT (Diagnostica Stago, K.C Prest 5) durante exactamente 3 min. La coagulación comenzó volviendo a calcificar las muestras con 0,05 ml de solución de cloruro cálcico precalentada 0,025 M. Un coagulómetro automático (AMAX 200, Trinity Biotech, Lemgo, Alemania) mezcló el plasma a 37°C y registró mecánicamente el tiempo hasta la coagulación. Se calculó y se notificó la concentración de fármaco de ensayo que prolongaba aPTT en un factor de 1,5 (Figura 9).

Experimento 9: Modelo de trombosis de babuino in vivo.

En un modelo de derivación AV de babuino, la formación de trombos se inició mediante el despliegue temporal de un dispositivo trombogénico en la derivación AV crónica hipotrombogénica. El dispositivo trombogénico que se usó para evaluar el efecto de los anticuerpos sobre la iniciación y propagación de trombos consistió en un injerto de ePTFE recubierto con colágeno de 4 mm de diámetro interno (d.i.), de 20 mm de largo que fue seguido por una cámara de expansión de caucho de silicona de 9 mm de d.i., de 20 mm de largo. Se entiende que la velocidad de cizallamiento en el injerto imita la coagulación de la sangre de tipo arterial y se entiende que la velocidad de cizallamiento en la cámara de expansión imita la coagulación de la sangre de tipo venoso. La formación de trombos se evaluó en tiempo real durante los experimentos mediante generación de imágenes con cámara gamma cuantitativa de acumulación de plaquetas radiomarcadas dentro del segmento de injerto, y mediante determinaciones de punto final de depósito de fibrinógeno/fibrina radiomarcado (para más detalles véase Tucker et al. Blood. 22 de enero de 2009; 113(4):936-944, página 937, columna izquierda, capítulo titulado por "Thrombosis model"). Como se muestra en la Figura 10, la aplicación intravenosa de 1 mg/kg en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de TPP-3583 condujo a una reducción del depósito de plaquetas en aproximadamente 80%. Estos datos son comparables a la actividad antitrombótica del anticuerpo 1A6 murino publicado por Tucker et al. (Blood. 22 de enero de 2009; 113(4):936-944).

Por debajo de la inhibición del depósito de plaquetas, la administración de TPP-3583 también condujo a una reducción significativa de la acumulación de fibrina en el injerto recubierto de colágeno en aproximadamente 80% (Figura 11).

Tabla 1: secuencias polipeptídicas de los anticuerpos TPP-3583 y TPP-3577

anticuerpo	SEQ ID NO:									
	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	VH	Cadena ligera	Cadena pesada
TPP-3583	8	9	10	11	12	13	17	18	27	28
TPP-3577	14	9	10	11	15	16	19	20	29	30

Tabla 2: secuencias polinucleotídicas de los anticuerpos TPP-3583 y TPP-3577

anticuerpo	SEQ ID NO:									
	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	VH	Cadena ligera	Cadena pesada
TPP-3583	-	-	-	-	-	-	31	32	-	-
TPP-3577	-	-	-	-	-	-	33	34	-	-

Tabla 3: secuencias polipeptídicas de otros anticuerpos

anticuerpo	SEQ ID NO:									
	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	VH	Cadena ligera	Cadena pesada
1A6	1	2	3	4	5	6	25	26	-	-
TPP-3290	-	-	-	-	-	-	21	22	35	36
TPP-3238	-	-	-	-	-	-	23	24	37	38

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al factor XI humano y/o al factor XIa humano, que comprenden
 - (a) una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia KASQSVLYSGDNYLN (SEQ ID NO:8);
 - 5 (b) una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia AASTLES (SEQ ID NO: 9);
 - (c) una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia QQYNGDPWT (SEQ ID NO: 10);
 - (d) una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia TSGMGVG (SEQ ID NO: 11);
 - (e) una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia HIDWDDDKYYSPSLKS (SEQ ID NO: 12); y
 - (f) una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia IRSSVYAHYYGMDY (SEQ ID NO:13).
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 que comprenden una región V_L representada en SEQ ID NO: 17.
3. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una región V_H representada en SEQ ID NO: 18.
- 15 4. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una región V_L representada en SEQ ID NO: 17 y una región V_H representada en SEQ ID NO: 18.
5. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27.
- 20 6. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28.
7. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera representada en SEQ ID NO: 27 y una cadena pesada representada en SEQ ID NO: 28.
- 25 8. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal quimérico.
9. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal es una IgG, preferiblemente una IgG1 o IgG4.
- 30 10. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un vector, que comprende un polinucleótido como se define en la reivindicación 10.
12. Una célula anfitriona que comprende un vector según la reivindicación 11 y/o un polinucleótido según la reivindicación 10.
- 35 13. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula anfitriona definida en la reivindicación 12 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y opcionalmente recuperar del cultivo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo producidos.
- 40 14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o producidos según el procedimiento de la reivindicación 13, el polinucleótido de la reivindicación 10, el vector de la reivindicación 11 y/o la célula anfitriona de la reivindicación 12 y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 16. La composición farmacéutica según la reivindicación 14 o 15, que comprende adicionalmente uno o más agentes activos adicionales.
17. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 9 o producidos según el procedimiento de la reivindicación 13, el polinucleótido según la reivindicación 10, el vector según la reivindicación 11, la célula anfitriona según la reivindicación 12 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para su uso como un medicamento.

5 18. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o producidos según el procedimiento de la reivindicación 13, el polinucleótido según la reivindicación 10, el vector según la reivindicación 11, la célula anfitriona según la reivindicación 12 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas.

10 19. Un kit que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o producidos según el procedimiento de la reivindicación 13, el polinucleótido según la reivindicación 10, el vector según la reivindicación 11, la célula anfitriona según la reivindicación 12 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

Figura 1**SEQ ID NO: 8 (CDR1 LC)**

KASQGVLYGGDNYLN

SEQ ID NO: 9 (CDR2 LC)

AASTLES

SEQ ID NO: 10 (CDR3 LC)

QGYNGDDNT

SEQ ID NO: 11 (CDR1 HC)

TGGMGV

SEQ ID NO: 12 (CDR2 HC)

HIDWDGNYSPSLKS

SEQ ID NO: 13 (CDR3 HC)

IRSSVYAEYQNDY

SEQ ID NO: 17 (VL)

QIVRTQSPDS	LAVSLGRAT	ISCKASQSVL	YSGDNYLWY	QCKPQZFFKL	LIYAASTLES	60
QIPDRFSGSG	SGTEFTLTIS	SLQASDVAVY	YQCYNGDFW	TPGGGTXVEI	K	111

SEQ ID NO: 18 (VH)

SVTLRDSGPA	LVKFTQDLIL	TCITSGFELS	TGGMGVGNIP	QPPGKALEWL	AHIDWDGNY	60
YSPSLSRALT	ISKETSKNQV	VLTMTNMDPV	DTATYYCAKI	RSRVYAEYYS	MDYWGQDTTV	120
TVAS						124

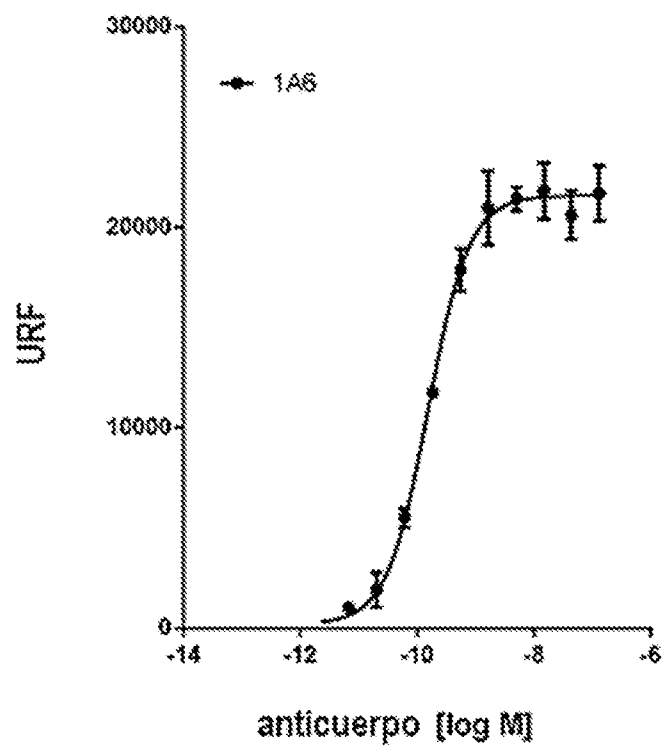
SEQ ID NO: 27 (LC)

QIVRTQSPDS	LAVSLGRAT	ISCKASQSVL	YSGDNYLWY	QCKPQZFFKL	LIYAASTLES	60
QIPDRFSGSG	SGTEFTLTIS	SLQASDVAVY	YQCYNGDFW	TPGGGTXVEI	KRIYAAPGVF	120
TFPPQDSQLK	SGTASVGLL	NNYFPEAKY	QWKVDNALQS	GNRQESVTEQ	GGRDSTYSLS	180
STLTLSKADY	EKKVYACIV	TRQGLSGDVT	KSENRGEC			218

SEQ ID NO: 28: (HC)

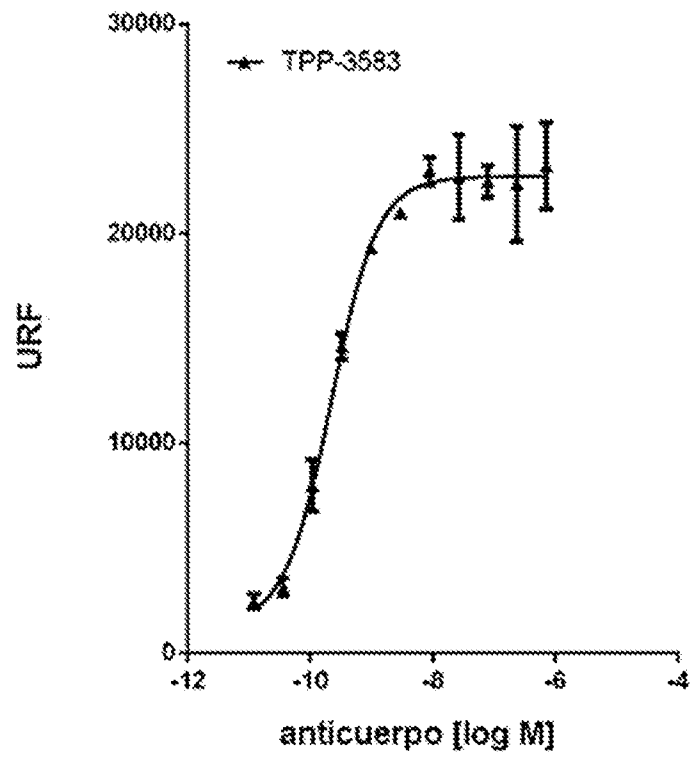
SVTLRDSGPA	LVKFTQDLIL	TCITSGFELS	TGGMGVGNIP	QPPGKALEWL	AHIDWDGNY	60
YSPSLSRALT	ISKETSKNQV	VLTMTNMDPV	DTATYYCAKI	RSRVYAEYYS	MDYWGQDTTV	120
TVASASTKGF	SVFTLAPSK	STSGGTAALS	CLVKNYFFEP	VTGWNAGAL	TGGVETIPAV	180
LQASCLYSLS	SVTVFASGL	GTQYFICNVN	HRKNTKVDX	KVEFESCKE	STCPPCDAPE	240
LLOGPSVLEF	PKPKDILKI	SRTEFTICVY	VGVSHDDPEV	KFNWYDQVE	VHRANTKPRE	300
QQYNSTYKVV	SVLTVLGGW	LNGNEYCKY	SKKALFAPIE	KYISKAKQGF	KSPQVETLPP	360
SRDELTKNQV	SLTCLVSGTY	PSDIAVKES	NOQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FTLYSRLTVD	420
KSEKQDQNVY	QGVVNHGALH	NHYTKGLSL	SPG			453

Figura 2



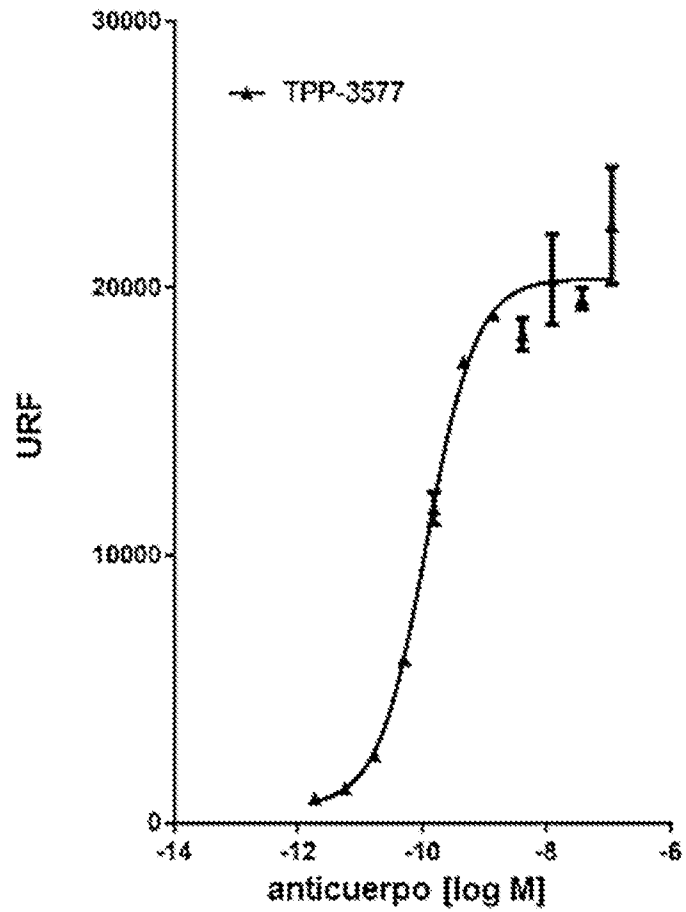
	1A6
CE50	1.542e-010

Figura 3



	CE50
TPP-3583	2.191e-010

Figura 4



	TPP-3577
CE50	1.188e-010

Figura 5

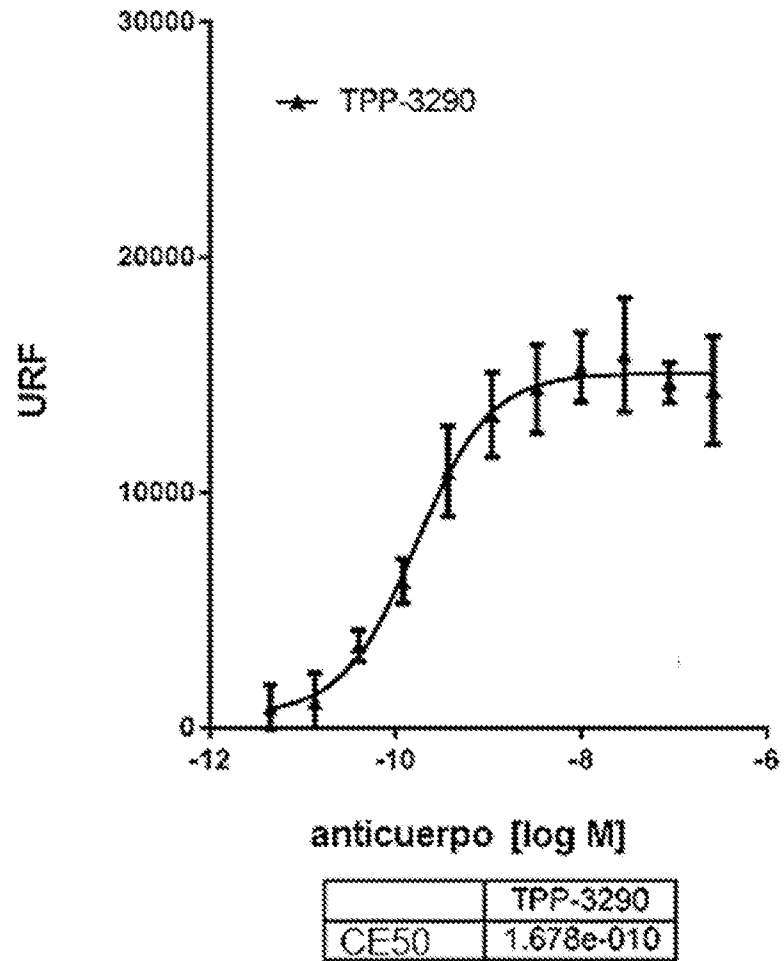
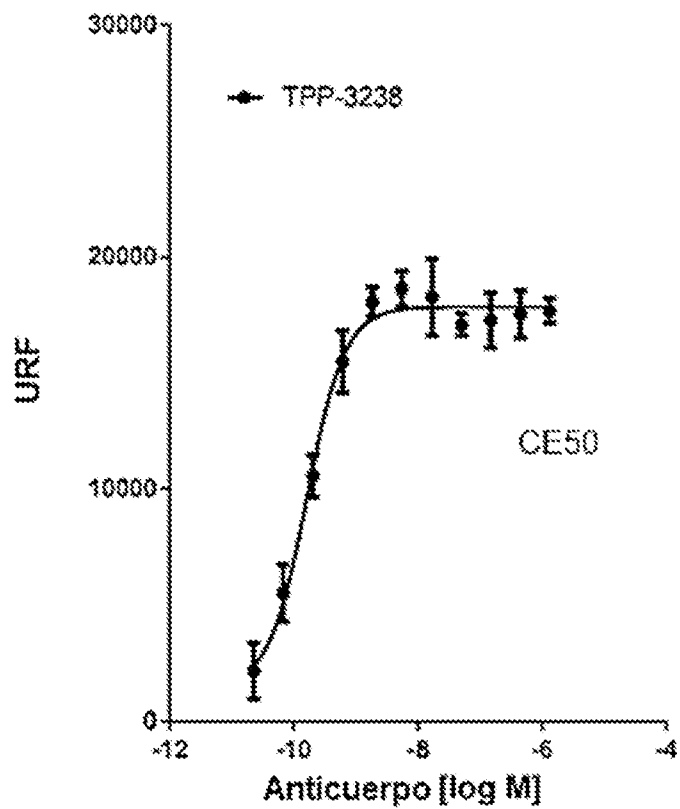
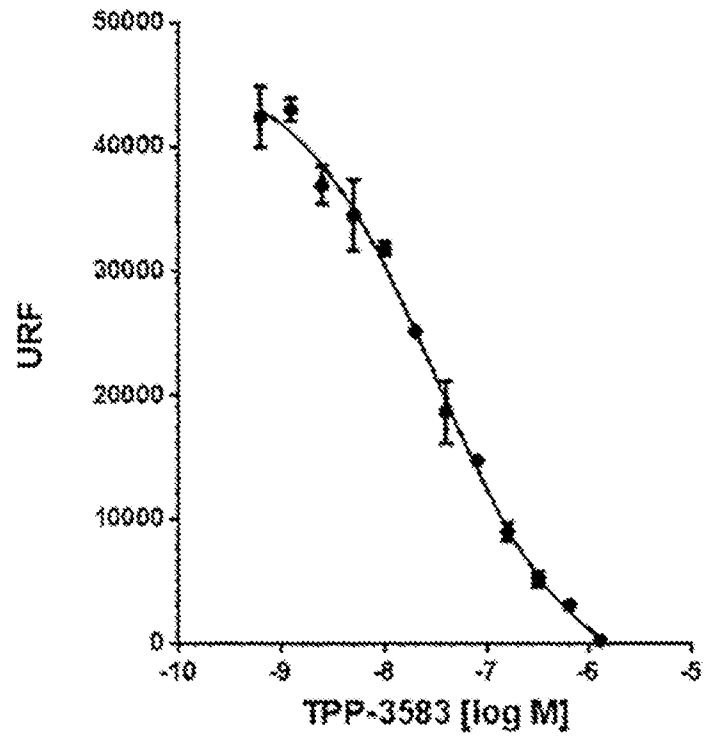


Figura 6



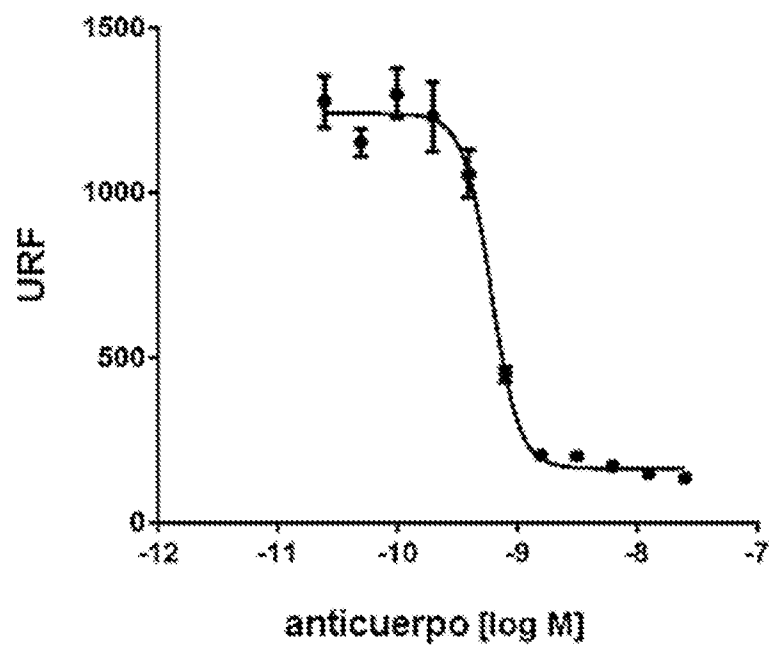
	EC50
TPP-3238	1.652e-010

Figura 7



	TPP-3583
CE50	3.139e-008

Figura 8



	TPP-3583
CI50	5.976e-010

Figura 9

denominación	CE50 ELISA [nM] (FXI humano)	CE50 ELISA [nM] (FXI babuino)	CE50 [nM] Ensayo de Conversión (FXI humano)	aPTT 1,5 X [nM]
1A6	0.15 +/- 0.03	0.16 +/- 0.02	0.5 +/- 0.03	7
TPP-3583	0.2 +/- 0.02	0.13 +/- 0.02	0.6 +/- 0.04	5
TPP-3577	0.19 +/- 0.02	0.16 +/- 0.02	0.4 +/- 0.02	11
TPP-3290	0.17 +/- 0.03	0.14 +/- 0.02	0.4 +/- 0.02	93
TPP-3238	0.16 +/- 0.02	0.28 +/- 0.02	0.6 +/- 0.03	> 500

Figura 10

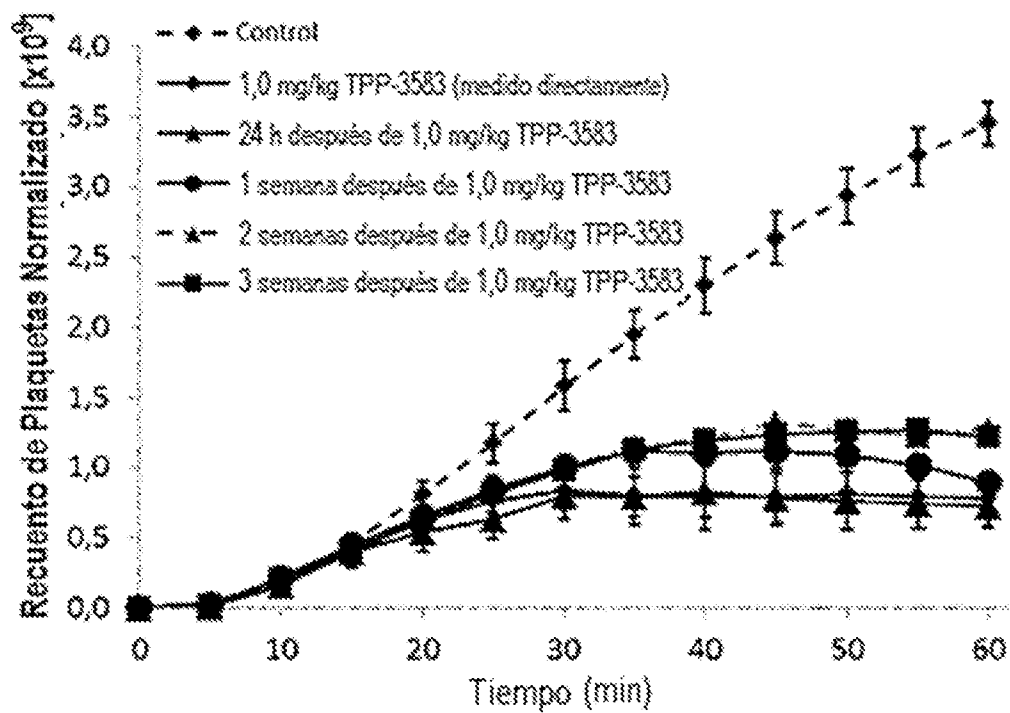


Figura 11